

Tesis Doctoral

Regulación múltiple de la función del sistema TRAIL en apoptosis

Ana Cano González

Marzo, 2017



Dr. Abelardo López Rivas, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y miembro del Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER),

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado **“Regulación múltiple de la función del sistema TRAIL en apoptosis”** presentado por **Doña Ana Cano González**, para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Sevilla, ha sido realizado bajo su supervisión en el Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa y reúne, a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea defendido ante el tribunal correspondiente.

Y, para que conste a los efectos oportunos, expido y firmo el presente certificado en Sevilla a 12 de diciembre de 2016.



Fdo.
Dr. Abelardo López Rivas
Director



Fdo.
Dr. Ricardo Pardal Redondo
Tutor de la Universidad de Sevilla

A mis padres

“La ciencia no sólo es una disciplina de la razón, sino también del romance y de la pasión.”

Stephen Hawking

Índice global

Índice de contenidos	III
Lista de figuras	XI
Abreviaturas	XIX
Resumen	3
Introducción	7
Objetivos	89
Materiales y métodos	93
Resultados:	
Capítulo I. Papel de las rutas de señalización MAPK/ERK y PI3K/AKT en la señalización de apoptosis por el ligando TRAIL.	125
Capítulo II. Regulación por el oncogén ErbB2/Her2 de la activación de apoptosis por TRAIL en células epiteliales de mama humanas	141
Capítulo III. Estudio de la función reguladora de EGF y TGF- β en la señalización de apoptosis por TRAIL.	159
Capítulo IV. Papel del sistema TRAIL en el destino celular tras estrés en el retículo endoplasmático.	187
Discusión:	
Discusión capítulo I.	213
Discusión capítulo II.	221
Discusión capítulo III.	227
Discusión capítulo IV.	231
Conclusiones	239
Referencias	243
Anexo: Publicaciones	287

Índice de contenidos

Índice de contenidos

LISTA DE FIGURAS	XI
ABREVIATURAS.....	XIX
RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN	
1. Mecanismos de muerte celular.....	7
1.1. Apoptosis.....	9
1.1.1. Caspasas	11
1.1.2. Rutas de apoptosis	18
1.2. Autofagia.....	24
1.2.1. Mecanismos de autofagia	25
1.2.2. Muerte celular autofágica	28
1.2.3. Conexión entre apoptosis y autofagia	29
1.3. Necrosis programada: Necroptosis.....	32
2. APO2L/TRAIL	35
2.1. Receptores de TRAIL.....	37
2.2. Señalización apoptótica de TRAIL.....	38
2.2.1. Regulación de la apoptosis inducida por TRAIL	40
2.3. Señalización no apoptótica de TRAIL.....	44
2.4. APO2L/TRAIL como terapia antitumoral.....	46
3. La familia del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR/ErbB) en cáncer....	49
3.1. Familia EGFR/ErbB y ligandos.....	50
3.2. Señalización mediada por ErbB.....	51
3.3. ErbB-2 (neu/HER2).....	51
4. La transición epitelio-mesénquima.....	53
4.1. Tipos de EMT.....	55
4.2. EMT y cáncer.....	58
4.2.1. EMT en la regulación de la cascada metastásica	59
4.2.2. EMT y células madre cancerígenas	61
4.2.3. EMT y resistencia a tratamientos tumorales	62
4.3. Vías de señalización de la EMT.....	63
5. La familia de proteínas de TGFβ.....	65

5.1. TGF β : Vías de señalización.....	65
5.2. Funciones biológicas de TGF β y su relación con el cáncer.....	68
6. Estrés en el retículo endoplasmático y UPR.....	70
6.1. Rutas de señalización de la UPR.....	72
6.1.1. Sensando el estrés: Papel de GRP78/BiP.....	73
6.1.2. Señalización de IRE-1.....	74
6.1.3. Señalización de PERK.....	75
6.1.4. Señalización de ATF6.....	76
6.1.5. Control temporal e interrelación entre los tres brazos de la UPR.....	76
6.2. UPR en la supervivencia y en la muerte celular.....	77
6.2.1. Regulación de la apoptosis por la UPR.....	78
6.3. UPR y cáncer.....	82
6.3.1. UPR en la progresión tumoral.....	83
6.3.2. UPR en la metástasis y la invasión celular.....	84
6.3.3. UPR en la terapia frente al cáncer.....	85
OBJETIVOS.....	89
MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Materiales	93
1.1. Cultivos celulares.....	93
1.2. Reactivos.....	95
1.3. Anticuerpos.....	98
1.3.1. Anticuerpos primarios.....	98
1.3.2. Anticuerpos secundarios.....	101
1.4. ARN de interferencia.....	101
2. Métodos	102
2.1. Cuantificación de apoptosis.....	102
2.2. Cuantificación de células viables: Tinción con cristal violeta.....	102
2.3. Medida de la concentración de proteínas.....	103
2.4. Inmunodetección de proteínas por western-blot.....	103
2.5. Producción de TRAIL recombinante y TRAIL biotinilado.....	105
2.6. Análisis del DISC de TRAIL.....	106
2.7. Análisis de E-caderina y de los receptores de TRAIL en la superficie celular.....	106
2.8. Análisis de la internalización de los receptores de TRAIL mediada por ligando.....	107
2.9. Fraccionamiento celular.....	107

2.10. Transfección transitoria con oligos de RNA de interferencia (siRNA).....	108
2.11. Producción viral.....	108
2.12. Infección viral.....	111
2.13. RT-PR.....	111
2.14. RT-Q-PCR.....	113
2.15. RT-MLPA.....	114
2.16. Inmunofluorescencia.....	115
2.17. Estudios de morfogénesis	
2.17.1. Cultivos tridimensionales de células epiteliales	116
2.17.2. Inmunofluorescencia 3D	117
2.17.3. Análisis de las muestras por microscopía confocal.	117
2.17.4 Medios de cultivo y soluciones utilizadas.	118
2.17.5. Análisis de la muerte celular: tinción por Bromuro de etidio.	118
2.18. Ensayo de mamóferas.....	119
2.19. Ensayo de tumorigenicidad. Crecimiento en Soft-Agar.....	119
2.20. Análisis de marcadores CD44+/CD24-/low.....	120
2.21. Análisis estadístico.....	121

RESULTADOS

CAPITULO I: Papel de las rutas de señalización MAPK/ERK y PI3K/AKT en la señalización de apoptosis por el ligando TRAIL.....	125
1.1 La Inhibición prolongada de la ruta de MAPK/ERK en células epiteliales de mama, incrementa los niveles de FLIP e inhibe la apoptosis inducida por TRAIL.....	125
1.2 El tratamiento simultáneo de TRAIL y los inhibidores de MAPK/ERK y PI3K/AKT, potencia la apoptosis inducida por TRAIL en células normales epiteliales de mama.....	129
1.3 El tratamiento simultáneo de TRAIL y los inhibidores de MAPK/ERK y PI3K/AKT, favorece la señalización apoptótica temprana de TRAIL.....	131
1.4 Regulación diferencial entre líneas tumorales y normales de los niveles de FLIP (L)...	135
CAPITULO II: Regulación por el oncogén ErbB2/Her2 de la activación de apoptosis por TRAIL en células epiteliales de mama humanas.....	141
2.1 Las células epiteliales de mama que sobreexpresan una forma constitutivamente activa del oncogen ErbB2/Her2 muestran características tumorigénicas.....	141
2.2 Las células epiteliales de mama que sobreexpresan el oncogen ErbB2/Her2 son más sensibles a la apoptosis inducida por TRAIL.....	145
2.3 El estado mesenquimal de las células epiteliales de mama no está relacionado con	148

la sensibilidad de las células a TRAIL.	
2.4 La activación de las rutas de MAPK/ERK, PI3K/AKT y mTOR favorece la apoptosis inducida por TRAIL en células no tumorales MCF10A.....	153
2.5 Las células epiteliales de mama que sobreexpresan el oncogen p95HER2 son más sensibles a la apoptosis inducida por TRAIL.....	155
CAPITULO III: Estudio de la función reguladora del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento transformante (TGF-β) en la señalización de apoptosis por TRAIL.....	159
3.1 TGF- β inhibe la sensibilización mediada por EGF de células no tumorales epiteliales de mama a la apoptosis inducida por TRAIL.....	159
3.2 La transición epitelio-mesénquima no es necesaria para la inhibición mediada TGF- β de la apoptosis inducida por TRAIL en células no tumorales epiteliales de mama.....	163
3.3. TGF- β reduce específicamente los niveles de expresión de TRAIL-R2/DR5 en la superficie celular.....	168
3.4. TGF- β provoca la acumulación intracelular de TRAIL-R2/DR5 mediante un proceso independiente de ligando.....	174
3.5 TGF- β induce autofagia citoprotectora en células humanas epiteliales de mama.....	181
CAPITULO IV: Papel del sistema TRAIL en el destino celular tras estrés en el retículo endoplasmático.....	187
4.1 Líneas tumorales triple negativas son más sensibles a estímulos inductores de estrés en el retículo endoplasmático.....	187
4.2 La muerte inducida por estímulos de estrés en el retículo endoplasmático no depende exclusivamente de la ruta extrínseca de TRAIL en células tumorales de mama triple negativas.....	190
4.3 La inhibición simultánea de la ruta extrínseca e intrínseca disminuye significativamente la apoptosis inducida por taspargina en células tumorales de mama triple negativas.....	193
4.4 Papel de los sensores de la UPR en la apoptosis inducida por estrés en el retículo endoplasmático en células tumorales de mama triple negativas.....	198
4.5 cFLIP regula la muerte por estrés en el RE en células tumorales de mama.....	206
DISCUSIÓN	
CAPITULO I.....	213
CAPITULO II.....	221
CAPITULO III.....	227

CAPITULO IV.....	231
CONCLUSIONES.....	239
BIBLIOGRAFÍA.....	243
ANEXO: PUBLICACIONES.....	287

Lista de figuras

Lista de figuras

FIGURAS INTRODUCCIÓN

▪ Figura 1: Etapas del proceso de apoptosis	10
▪ Figura 2: Estructura de las caspasas apoptóticas	12
▪ Figura 3: Estructura y mecanismo de activación de caspasa iniciadoras y efectoras	13
▪ Figura 4: Plataformas de activación de las caspasa iniciadoras	14
▪ Figura 5: Regulación de la actividad caspasa-8 por cFLIP	17
▪ Figura 6: Estructura e interacciones entre los miembros de la familia Bcl-2	20
▪ Figura 7: Rutas de apoptosis intrínseca y extrínseca	23
▪ Figura 8: Tipos de autofagia	25
▪ Figura 9: Mecanismo de autofagia en mamíferos	27
▪ Figura 10: Mecanismos moleculares implicados en la regulación del balance entre apoptosis y autofagia	31
▪ Figura 11: Necroptosis mediada por TNF α	34
▪ Figura 12: Estructura cristalina del trímero APO2L/TRAIL unido a tres moléculas de TRAIL-R2/DR5	35
▪ Figura 13: Receptores de TRAIL	37
▪ Figura 14: Señalización de apoptosis inducida por TRAIL	39
▪ Figura 15: Mecanismos de regulación de la apoptosis inducida por TRAIL	42
▪ Figura 16: Complejo secundario de TRAIL.	45
▪ Figura 17: Progreso de los anticuerpos agonistas frente al sistema TRAIL en ensayos clínicos	48
▪ Figura 18: Familia EGFR/ErbB y ligandos	50
▪ Figura 19: Proceso de transición epitelio-mesénquima	54
▪ Figura 20: EMT de tipo I: gastrulación	56
▪ Figura 21: La plasticidad del proceso de EMT permite que las células tumorales adquieran adaptaciones funcionales durante el proceso de invasión y metástasis	60
▪ Figura 22: Relación cruzada entre EMT-TFs y factores asociados a “stemness”	62
▪ Figura 23: Eventos celulares durante la EMT	64
▪ Figura 24: Señalización de TGF β a través de la ruta dependiente e independiente de proteínas SMAD	66

▪ Figura 25: Mecanismo molecular de inducción de EMT por TGF β	69
▪ Figura 26: Estructura y funciones generales del Retículo Endoplasmático (RE)	71
▪ Figura 27: Respuesta celular a estrés en el retículo endoplasmático en mamíferos (UPR)	73
▪ Figura 28: Activación y señalización de PERK en respuesta a estrés en el RE	75
▪ Figura 29: Destino celular tras estrés en el RE	78
▪ Figura 30: Señalización de PERK en la inducción de apoptosis por estrés en el RE	79
▪ Figura 31: Señalización de IRE-1 α en la inducción de apoptosis por estrés en el RE	81
▪ Figura 32: Estrés en el RE como diana antitumoral	85

FIGURAS RESULTADOS

▪ Figura 1 La inducción de las rutas de MAPK/ERK y PI3K/AKT en células MCF10A por TRAIL es dependiente de caspasa 8	127
▪ Figura 2 En células epiteliales de mama, la inhibición prolongada de la ruta de MAPK/ERK, permite el aumento en los niveles de cFLIP(L) y protege a las células de la apoptosis inducida por TRAIL	128
▪ Figura 3 El tratamiento simultáneo de los inhibidores de la ruta de MAPK/ERK y PI3K/AKT favorece la apoptosis inducida por TRAIL	130
▪ Figura 4 Señalización temprana inducida por TRAIL	132
▪ Figura 5 El efecto pro-apoptótico de la inhibición de las rutas de MAPK/ERK y AKT no se debe a una inhibición de la internalización	133
▪ Figura 6 Papel dual de las rutas de señalización MAPK/ERK y PI3K/AKT en la señalización de apoptosis por el ligando TRAIL en células normales no transformadas	135
▪ Figura 7 La inducción de las rutas de quinasas en células HeLa por TRAIL es dependiente de caspasa 8	136
▪ Figura 8 La inhibición de las rutas de MAPK/ERK y PI3K/AKT en líneas tumorales, favorece en cualquier caso la apoptosis inducida por TRAIL	137
▪ Figura 9 En líneas tumorales, la inhibición prolongada de las rutas de MAPK/ERK y PI3K/AKT no induce el incremento en los niveles de cFLIP(L)	138
▪ Figura 10 Regulación diferencial de los niveles de FLIP en líneas normales y tumorales	139
▪ Figura 11 Respuesta de células normales y tumorales a la inhibición prolongada de las rutas de PI3K/AKT y MAPK/ERK	140
▪ Figura 12 Modelo celular de células MCF10A que sobreexpresan formas normales (wt) o constitutivamente activas del oncogen ErbB2/Her2/Neu	142

▪ Figura 13 Células MCF10A transformadas con una forma constitutivamente activa del oncogén ErbB2/Her2 muestran características tumorigénicas	144
▪ Figura 14 Sobreexpresión en células MCF10A de una forma constitutivamente activa del oncogén ErbB2/Her2 incrementa la sensibilidad a la apoptosis inducida por TRAIL	146
▪ Figura 15 Sensibilidad a TRAIL de células MCF10A transformadas con una forma constitutivamente activa del oncogén ErbB2/Her2 en cultivos tridimensionales	148
▪ Figura 16 Sobreexpresión en células MCF10A de una forma constitutivamente activa del oncogén ErbB2/Her2 induce la adquisición de un fenotipo mesenquimal	149
▪ Figura 17 El EMT-TFs Snail no está implicado en la mayor sensibilidad de las células MCF10A p NeuT a la apoptosis inducida por TRAIL	150
▪ Figura 18 Sensibilidad a TRAIL del modelo celular de EMT generado a partir de la línea HMEC-hTERT	152
▪ Figura 19 Efecto sobre la sensibilidad a TRAIL de la inhibición de las rutas de MAPK/ERK y PI3K/AKT y mTOR en el modelo celular de células MCF10A que sobreexpresan formas normales (wt) o constitutivamente activas del oncogén ErbB2/Her2/Neu	154
▪ Figura 20 Efecto sobre la sensibilidad a TRAIL de la inhibición del receptor de ErbB2 en el modelo celular de células MCF10A que sobreexpresan formas normales (wt) o constitutivamente activas del oncogén ErbB2/Her2/Neu	155
▪ Figura 21 Sobreexpresión de p95Her2/611CTF en células humanas epiteliales de mama MCF10A incrementa la sensibilidad de las células a TRAIL	157
▪ Figura 22 TGF- β inhibe la sensibilización a la apoptosis inducida por TRAIL mediada por EGF en células humanas no tumorales epiteliales de mama	160
▪ Figura 23 TGF- β inhibe la sensibilización a la apoptosis inducida por TRAIL mediada por EGF únicamente en células humanas epiteliales de mama	161
▪ Figura 24 El tratamiento con TGF- β no afecta a los componentes del DISC de TRAIL	162
▪ Figura 25 TGF- β inhibe la señalización temprana inducida por TRAIL	163
▪ Figura 26 El tratamiento de 24 horas con TGF- β no induce EMT en células epiteliales no tumorales de mama	165
▪ Figura 27 La E-caderina no está implicada en sensibilidad a TRAIL de células no tumorales de mama	166
▪ Figura 28 TGF- β inhibe la apoptosis inducida por TRAIL en células con fenotipo mesenquimal MCF10A que sobreexpresan una forma mutada de ErbB2	167

▪ Figura 29 La expresión de TRAIL-R2 en la superficie celular se reduce tras un tratamiento con TGF- β	168
▪ Figura 30 El tratamiento con TGF- β reduce específicamente los niveles de TRAIL-R2 en la superficie celular	169
▪ Figura 31 TRAIL-R2 es el principal receptor pro-apoptótico en células MCF10A	170
▪ Figura 32 La reducción de los niveles de TRAILR2 en la superficie celular correlaciona directamente con la inhibición de la activación de caspasa-8	171
▪ Figura 33 El tratamiento con TGF- β induce una localización intracelular de TRAIL-R2	172
▪ Figura 34 La tinción de TRAIL-R2 es específica	173
▪ Figura 35 La inhibición del transporte del RE al Ap. de Golgi reduce los niveles de TRAIL-R2 en la superficie celular	175
▪ Figura 36 TRAIL-R2 no colocaliza con Retículo endoplasmático o Golgi	176
▪ Figura 37 TRAIL-R2 no colocaliza con proteínas de la ruta endosómica	179
▪ Figura 38 El tratamiento con TGF β induce la expresión de TRAIL	179
▪ Figura 39 La internalización del TRAIL-R2 es independiente de ligando	180
▪ Figura 40 TGF β induce autofagia en células epiteliales de mama I	182
▪ Figura 41 TGF β induce autofagia en células epiteliales de mama II	183
▪ Figura 42 La autofagia inducida por TGF-beta es citoprotectora	184
▪ Figura 43 Papel de TGF- β en la regulación de la apoptosis inducida por TRAIL	185
▪ Figura 44: Líneas tumorales triple negativas son más sensibles a estímulos inductores de estrés en el retículo endoplasmático	188
▪ Figura 45: La muerte inducida por estímulos de estrés en el retículo endoplasmático es dependiente de caspasas	189
▪ Figura 46: La sobreexpresión de Bcl-XL inhibe la muerte inducida por estímulos de estrés en el retículo endoplasmático	190
▪ Figura 47: La inhibición de la activación de la ruta extrínseca no es suficiente para bloquear la apoptosis inducida por taspigargina en células tumorales triple negativas	191
▪ Figura 48: Caspasa 8 no participa en la apoptosis inducida por estrés en el retículo en células tumorales de mama triple negativas	192
▪ Figura 49: Análisis RT-MLPA en líneas tumorales de mama triple negativas y luminales tras tratamiento con taspigargina	194
▪ Figura 50: El silenciamiento de las proteínas BH3-only Noxa, Bim o Puma no es suficiente para inhibir la apoptosis inducida por taspigargina	195

▪ Figura 51: La muerte por estrés en el RE depende de la activación de la ruta extrínseca y la intrínseca	197
▪ Figura 52: Activación diferencial de la UPR en células tumorales de mama triple negativas	199
▪ Figura 53: Papel de la UPR en la apoptosis inducida por estrés en el retículo endoplasmático	200
▪ Figura 54: Papel de ATF4 en la apoptosis inducida por taspigargina I	202
▪ Figura 55: Papel de ATF4 en la apoptosis inducida por taspigargina II	203
▪ Figura 56: La ruta de ATF4 regula la activación de la ruta extrínseca	204
▪ Figura 57: Mecanismo de sensibilización a estrés en el retículo endoplasmático en células tumorales de mama triple negativas	205
▪ Figura 58: En células tumorales de mama el tratamiento con taspigargina no afecta a los niveles de FLIP	206
▪ Figura 59: El silenciamiento de FLIP (L) acelera la apoptosis inducida por taspigargina en células MDA-MB231	207
▪ Figura 60: FLIP(L) regula la apoptosis inducida por taspigargina en células tumorales de mama	208

Abreviaturas

ABREVIATURAS

3D	Tridimensional
4EBP1	Proteína 1 de unión a elF4E (<i>del inglés, eIF4E Binding Protein 1</i>)
AIF	Factor inductor de apoptosis (<i>del inglés, Apoptotic Inducing Factor</i>)
AMPK	Quinasa activada por AMP (<i>del inglés, AMP-activated Protein Kinase</i>)
APAF-1	Factor 1 activador de proteasas apoptóticas (<i>del inglés, Apoptotic Protease-Activating Factor-1</i>)
APS	Persulfato de amonio (<i>del inglés, Amonium Persulfate</i>)
ATF4	<i>del inglés, Activating Transcription Factor 4</i>
ATF6	<i>del inglés, Activating Transcription Factor 6</i>
ATG	<i>del inglés, AuTophagy related Gene</i>
Bak	<i>del inglés, Bcl-2 homologous antagonist killer</i>
Bax	<i>del inglés, Bcl-2 associated X protein</i>
Bcl-2	<i>del inglés, B-Cell Lymphoma/Leukaemia 2</i>
Bcl-xl	<i>del inglés, Bcl-X-Long</i>
BH	Dominio de homología de las proteínas de la familia de Bcl-2 (<i>del inglés, Bcl-2 Homology</i>)
Bip/GRP78	<i>del inglés, Inmunoglobulin-Binding Protein/ Glucose Related Protein 78</i>
BNIP3	<i>del inglés, Bcl-2/adenovirus e1B 19kd-Interacting Protein 3</i>
BSA	Seroalbúmina bovina
CARD	Dominio reclutador de caspasas (<i>del inglés, caspase recruitment domain</i>)
CHOP	<i>del inglés, CCAAT/enhancer-binding Homologous Protein</i>
CHX	Cicloheximida
CRD	dominio rico en cisterna, de la región extracelular de receptores de la familia de TNF (<i>del inglés, cystein rich domain</i>)
CRD	Dominio rico en cisteínas (<i>del inglés, Cysteine-Rich-Domain</i>)
DAPI	Diaminofenilindol (<i>del inglés, 4',6-diamidino-2-phenylindole</i>)
DcR	Receptor señuelo (<i>del inglés, decoy deceptor</i>)
DD	Dominio de muerte (<i>del inglés, death domain</i>)
DED	Dominio efector de muerte (<i>del inglés, death effector domain</i>)
DEPC	Dietilpirocarbonato
DIABLO	Inhibidor directo de apoptosis (<i>del inglés, Direct Inhibitor of Apoptosis Binding protein with LOw PI</i>)
DISC	Complejo inductor de señales de muerte (<i>del inglés, death inducing signalling complex</i>)
DMEM	<i>del inglés, Dubelco's modified Eagle's medium</i>

DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>del inglés, Deoxyribonucleic acid</i>)
DR	Receptor de muerte (<i>del inglés, Death Receptor</i>)
DTT	Ditiotreitol
ECDH	E-Caderina.
ECL	Reactivo quimioluminiscente (<i>del inglés, Enhanced chemiluminescence</i>)
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico (<i>del inglés, Epidermal Growth Factor</i>)
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
eIF2	Factor de iniciación de la traducción eIF2 (<i>del inglés, Eucariotic Translation Initiation Factor 2</i>)
EMT	Transición epitelio-mesénquima (<i>del inglés, Epithelial to Mesenchymal Transition</i>)
EMT-TF	Factor de transcripción inductor de transición epitelio mesénquima (<i>del inglés, Epithelial to Mesenchymal Transition-Transcription Factor</i>)
ERAD	(<i>del inglés, ER-Associated Degradation</i>)
ERK	Quinasa regulada por señales intracelulares (<i>del inglés, Extracellular Signal Regulated Kinase</i>)
FADD	Dominio de muerte asociado a Fas (<i>del inglés, Fas-Associated Death Domain</i>)
FBS	Suero fetal bovino (<i>del inglés, foetal bovine serum</i>)
FITC	Isotiacinato de fluoresceína (<i>del inglés, Fluorescein isothiocyanate</i>)
FLIP	Proteína inhibidora de Caspasa-8 (<i>del inglés, FLICE-caspase-8 Inhibitory protein</i>)
GADD34	(<i>del inglés, Growth Arrest and DNA Damage-inducible 34</i>)
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato deshidrogenasa (<i>del inglés, Glyceraldehyde-3-Phosphate DeHydrogenase</i>)
GFP	Proteína verde fluorescente, (<i>del inglés, Green Fluorescent Protein</i>)
HRP	Peroxidasa de rábano (<i>del inglés, Horseradish peroxidase</i>)
hTERT	Transcriptasa reversa de la telomerasa humana (<i>del inglés, human TElomerase Reverse Transcriptase</i>)
IAP	Proteínas inhibidoras de apoptosis (<i>del inglés, Inhibitor of Apoptosis Proteins</i>)
IF	Inmunofluorescencia (<i>del inglés, ImmunoFluorescence</i>)
IRE-1	<i>del inglés, Inositol REquiring protein-1</i>
JNK	Quinasa N-terminal de c-Jun (<i>del inglés, c-Jun N-terminal Kinase</i>)
KDa	Quilodaltons
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno (<i>del inglés, Mitogen- activated protein kinase</i>)
Mcl-1	<i>del inglés, Mieloide cell leucemia sequence 1</i>

MEK	Quinasa de MAPK/ERK (<i>del inglés, MAPK/ERK kinase</i>)
mg	Miligramo
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MOMP	Permeabilización de la membrana mitocondrial externa (<i>del inglés, Mitochondrial outer membrane permeabilization</i>)
mTOR	Diana de rapamicina en mamíferos (<i>del inglés, Mammalian target Of Rapamycin</i>)
NF-κB	Factor nuclear kappa B (<i>del inglés, Nuclear factor Kappa B</i>)
ng	Nanogramo
nM	Nanomolar
nm	nanometros
NT	Células no tratadas, sin tratamiento
OPG	Osteoprotegerina
p70-S6K	Quinasa de la proteína ribosomal S6 (<i>del inglés, 70 kDa ribosomal protein S6 Kinase 1</i>)
PARP	Poli-ADP-ribosa polimerasa
PBS	Tampón fosfato (<i>del inglés, Phosphate-buffered saline</i>)
PCD	Muerte celular programada (<i>del inglés, Programmed Cell Death</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>del inglés, Polymerase Chain Reaction</i>)
PERK	<i>del inglés, protein kinase (PKR)-like ER kinase</i>
PI	Ioduro de propidio (<i>del inglés, propidium iodide</i>)
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa (<i>del inglés, Phosphatidylinositol 3- Kinase</i>)
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (<i>del inglés, Phenylmethyl sulphonyl fluoride</i>)
PS	Fosfatidilserina (<i>del inglés, Phosphatidilserine</i>)
PUMA	Modulador de apoptosis regulado por p53 (<i>del inglés, p53-Upregulated Modulator of Apoptosis</i>)
RE	Retículo Endoplasmático
RIP1	Proteína de interacción con el receptor (<i>del inglés, Receptor interacting protein 1</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (<i>del inglés, Ribonucleic acid</i>)
RNA_m	Ácido ribonucleico mensajero
RNase	Ribonucleasa (<i>del inglés, Ribonuclease</i>)
ROS	Especies reactivas de oxígeno (<i>del inglés, reactive oxygen species</i>)
rpm	Revoluciones Por Minuto
RTK	Receptor con actividad tirosín quinasa (<i>del inglés, Receptor Tyrosine Kinase</i>)

RT-PCR	Transcripción reversa de ARN y amplificación de ADN por Reacción en Cadena de la Polimerasa (<i>del inglés, Reverse Transcriptase-Polymerase-Chain Reaction</i>)
shRNA	<i>del inglés, Short hairpin RNA</i>
siRNA	RNA de interferencia (<i>Small interfering RNA</i>)
TA	Temperatura ambiente
TAE	Tris-acetato-EDTA
TE	Tris- EDTA
TG	Tapsigargina
TGF-β	Factor de crecimiento transformante- β (<i>del inglés, Transforming Growth Factor β</i>)
TGFβR1	Receptor 1 del factor de crecimiento transformante
TN	Tunicamicina
TNF	Factor de necrosis tumoral (<i>del inglés, Tumor Necrosis Factor</i>)
TRADD	Dominio de muerte asociado al receptor de TNF (<i>del inglés, TNF Receptor-Associated Death Domain</i>)
TRAF	Factor asociado al receptor de TNF (<i>del inglés, TNF Receptor- Associated Factor</i>)
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis de la familia de TNF (<i>del inglés, TNF Related Apoptosis Inducing Ligand</i>)
TRAIL-R	Receptor de TRAIL
UPR	Respuesta a proteínas mal plegadas (<i>del inglés, Unfolded Protein Response</i>)
XBP1	<i>del inglés, X-box Binding Protein-1</i>
μg	Microgramo
μl	Microlitro
μM:	Micromolar

Resumen



RESUMEN

El santo grial de la terapia frente al cáncer es encontrar un agente que elimine específica y eficientemente células tumorales, con poca o ninguna repercusión en células normales. A mediados de los años 90, el descubrimiento simultáneo de la molécula endógena de APO2L/TRAIL por el laboratorio de Ashkenazi en Genentech (Pitti et al. 1996) y el laboratorio de Ray Goodwin's en Immunex (Wiley et al. 1995) supuso una revolución en la aplicación de los ligandos de muerte a la clínica. APO2L/TRAIL es un ligando de muerte de la superfamilia de TNF, capaz de inducir selectivamente apoptosis en un amplio rango de células tumorales sin afectar a las células normales y que además, tanto en solitario como en combinación con quimioterapia, mostraba una significativa actividad antitumoral en modelos murinos xenoinjertados de cáncer.

Desafortunadamente y a pesar de los prometedores resultados preclínicos, su aplicación en ensayos clínicos ha sido decepcionante, debido en parte a la aparición de resistencia en tumores primarios y a la poca actividad de un rhTRAIL soluble de características farmacocinéticas subóptimas. Por otra parte, son muchas las incógnitas por resolver relativas al papel fisiológico de TRAIL en la progresión tumoral y los mecanismos responsables de la resistencia de células no tumorales y tumores primarios al tratamiento con TRAIL.

En esta tesis hemos estudiado los mecanismos que controlan la diferente sensibilidad de células normales y tumorales de mama, al ligando de muerte celular APO2L/TRAIL. En este sentido, hemos demostrado que tanto en células humanas epiteliales de mama como en líneas tumorales, TRAIL activa rutas de señalización no apoptóticas (MAPK/ERK y PI3K/AKT) de manera dependiente de caspasa-8 y describimos la existencia de un papel diferencial de la activación de estas rutas sobre la apoptosis inducida por TRAIL. En líneas no tumorales, la inhibición prolongada de las ruta de MAPK/ERK y PI3K/AKT previo al tratamiento con TRAIL, incrementa los niveles de cFLIP(L) a nivel de RNAm y de proteína, bloqueando la apoptosis. En contraposición, el tratamiento simultáneo con inhibidores específicos de ambas rutas de quinasas y TRAIL favorece la formación del DISC y potencia la sensibilidad de las células. En cuanto al papel de la activación de estas rutas de señalización en líneas tumorales demostramos que su función es únicamente anti-apoptótica y que se produce una regulación diferencial de los niveles de cFLIP que no se encuentran transcripcionalmente regulados por Myc, poniendo de manifiesto la existencia de mecanismos diferenciales de regulación de la sensibilidad a la muerte celular inducida por TRAIL.

En esta línea hemos descrito, cómo la sobreexpresión del oncogén ErbB2/Neu/Her2 en células humanas epiteliales de mama, induce un proceso de transformación tumoral que promueve la

adquisición de características mesenquimales e invasivas y una mayor sensibilidad a la apoptosis inducida por TRAIL. Sin embargo, observamos que esta mayor sensibilidad a TRAIL es independiente del estado mesenquimal de las células MCF10A pNeuT, así como de la proteína E-caderina y del EMT-TF Snail. Asimismo, y de acuerdo con datos previos mostrados en esta tesis, observamos que existe una regulación de la sensibilidad a TRAIL mediada por las rutas de MAPK/ERK, PI3K/AKT, de manera que la desregulación de estas rutas como consecuencia de la activación constitutiva del receptor de ErbB2 incrementa la apoptosis inducida por TRAIL.

Además, hemos demostrado que TGF- β impide la sensibilización a TRAIL mediada por EGF de células no tumorales epiteliales de mama a través de la activación de dos mecanismos independientes que implican la disminución en la superficie celular y posterior acumulación intracelular del receptor proapoptótico TRAIL-R2/DR5 y la inducción de autofagia citoprotectora. Ambos mecanismos son necesarios y colaboran en la inhibición por TGF- β de la apoptosis inducida por TRAIL revelando una regulación por EGF y TGF- β de la sensibilidad de células epiteliales de mama no tumorales a TRAIL que podría ser relevante durante la morfogénesis.

Finalmente, analizamos el papel del sistema TRAIL en el destino celular tras estrés en el retículo endoplásmico (RE) y determinamos el mecanismo de apoptosis implicado en la muerte diferencial de líneas tumorales de mama triple negativas (TNBC) frente a líneas tumorales luminales. De esta manera, demostramos que la sensibilidad a la muerte por estrés en el RE de líneas TNBC se debe por un lado a una mayor activación de la ruta de PERK/ATF4/CHOP que provoca un incremento en los niveles totales y en la superficie celular de TRAIL-R2/DR5 lo que conduciría a una mayor activación de caspasa 8 que, junto con la presencia de unos niveles basales mayores de proteínas BH3-only como Noxa, favorece la inducción de apoptosis en estas células. Por último, nuestros resultados indican que cFLIP es una proteína fundamental en la regulación del destino celular en respuesta a estrés en el RE y actualmente estamos interesados en conocer el mecanismo responsable de la regulación de los niveles de FLIP en condiciones de estrés en el RE en líneas tumorales de mama.

Introducción



1. Mecanismos de muerte celular.

El desarrollo y homeostasis de los organismos depende de un balance entre la supervivencia y la muerte celular, lo que en términos generales significa que no hay vida sin muerte y delimitar el proceso de transición entre ambos acontecimientos es una tarea compleja, incluso si el organismo de estudio es la unidad básica de la vida: la célula.

En 1842, Carl Vogt observaba y describía por primera vez el proceso de muerte celular en la espina dorsal y el cartílago adyacente de anfibios. De este modo, los primeros histólogos reconocían células que morían, detallando incluso morfologías que se corresponden con lo que actualmente denominamos apoptosis (Clarke & Clarke 1996). Sin embargo este proceso era considerado un evento pasivo y no fue hasta 1950 cuando A. Glücksmann catalogó los distintos tipos de muerte celular de acuerdo con su función, estableciendo aspectos comunes y reproducibles de la muerte celular como actividad biológica (Glücksmann 1951). Las primeras observaciones de muerte celular regulada se produjeron en la década de los 60 cuando el biólogo celular Richard A Lockshin que trabajaba en el laboratorio de Carroll M. Williams, describió el daño que se producía en los músculos intersegmentales de los gusanos de seda durante la metamorfosis y denominó a este proceso como **Muerte Celular Programada (PCD, del inglés *Programmed Cell Death*)** (Lockshin & Williams 1964). Simultáneamente, el embriólogo John W Saunders Jr, reconocía también la existencia de patrones reproducibles de muerte celular en embriones de pollo (Saunders 1966). De esta manera, fueron los hallazgos de Saunders's y Lockshin's los que supusieron la primera contribución al conocimiento actual de la PCD, enunciando la posibilidad de la regulación de la muerte celular y centrando su atención en los mecanismos genéticos y bioquímicos de este proceso (Lockshin & Zakeri 2001). Una década después, Schweichel and Merker describieron en embriones de ratón tratados con diferentes toxinas, la existencia de tres tipos de muerte celular con distintas características morfológicas, estableciendo así la primera clasificación (Schweichel & Merker 1973)

- **Muerte celular de tipo I:** caracterizado por la condensación de la cromatina, la retracción de pseudópodos, la reducción del citoplasma, la fragmentación nuclear y la división sin pérdida de integridad física o "blebbing" de la membrana plasmática y fagocitosis de la célula (apoptosis).
- **Muerte celular de tipo II:** caracterizada por una masiva vacuolización del citoplasma (autofagia)
- **Muerte celular de tipo III:** caracterizada por no presentar ninguna de las manifestaciones anteriores (necrosis)

Esta clasificación basada en la morfología celular ha sido tradicionalmente empleada, hasta que en 2012, el Comité de Nomenclatura de Muerte Celular (Nomenclature Committee on Cell Death, NCCD) propuso sustituirla por una nueva clasificación más objetiva, basada en parámetros bioquímicos cuantitativos (Galluzzi et al. 2012).

Desde un punto de vista general, la **muerte celular** implica una degeneración permanente e irreversible de las funciones celulares vitales. Sin embargo, debido a la ausencia de un único evento bioquímico que pueda ser considerado como punto de no retorno, el NCCD propone que una célula se considerará muerta cuando presente alguna de las siguientes características moleculares o morfológicas (Kroemer et al. 2009; Galluzzi et al. 2012; Galluzzi et al. 2014):

- Permeabilización y pérdida de función permanente de la membrana plasmática como barrera.
- Fragmentación celular completa dando lugar a los comúnmente denominados cuerpos apoptóticos.
- Fagocitosis y posterior degradación lisosomal.

Por otro lado, la NCCD propone clasificar los distintos tipos de muerte en dos grandes grupos, mutuamente excluyentes: **Muerte Celular Accidental (ACD) o Muerte Celular Regulada (RCD)**.

La Muerte Celular Accidental (ACD), se produce por acción severa de agentes físicos, químicos o mecánicos y no requiere la intervención de ninguna maquinaria molecular específica. Esto provoca que no pueda ser prevenida o modulada y por tanto no constituye una diana de estudio para el desarrollo de nuevas intervenciones terapéuticas. En contraposición, la Muerte Celular Regulada (RCD) implica una maquinaria molecular genéticamente codificada y por tanto puede ser alterada mediante el uso de herramientas farmacológicas o genéticas. Además, esta RCD es a menudo consecuencia de una respuesta adaptativa incapaz de restaurar la homeostasis del microambiente celular, por lo que mejorar la respuesta adaptativa de las células al estrés también permite regular este tipo de muerte. La RCD será denominada **Muerte Celular Programada (PCD)** cuando se produzca durante el desarrollo embrionario o postembrionario, la homeostasis tisular y las respuestas inmunes (Galluzzi et al. 2014).

A continuación, describimos las principales modalidades de muerte celular regulada: **Apoptosis, autofagia y Necroptosis**. Sin embargo, existen otros tipos de muerte celular descritos recientemente (Galluzzi et al. 2014; Galluzzi et al. 2012; Kroemer et al. 2009).

1.1. Apoptosis.

La apoptosis es un mecanismo de muerte celular empleado por organismos multicelulares, mediante el cual, una célula anormal que pone en riesgo la vida del organismo, es autodegradada de manera estrictamente regulada, segura y sin provocar daño a las células colindantes (Taylor et al. 2008; Ashkenazi 2008). Este proceso tiene un papel fundamental durante el desarrollo, el envejecimiento y como mecanismo homeostático que permite mantener el equilibrio entre las poblaciones celulares de los tejidos. Asimismo, la apoptosis constituye un mecanismo de defensa que permite la eliminación de células que han sido irreparablemente dañadas (Elmore 2007).

El término **apoptosis** (a-po-toe-sis) fue empleado por primera vez en 1972 en el clásico artículo de Kerr, Wyllie and Currie, para describir un tipo de muerte celular morfológicamente distinto a los entonces conocidos, caracterizado por la condensación de la cromatina, la fragmentación nuclear y el “blebbing” de la membrana plasmática (Kerr et al. 1972).

Durante los siguientes años se fueron caracterizando diferentes mecanismos bioquímicos implicados en este tipo de muerte, tales como la fragmentación nuclear de la cromatina en fragmentos de 180 pares de base, la translocación de la fosfatidilserina (PS) de la cara interna a la externa de la membrana plasmática y la existencia de proteínas implicadas en el reconocimiento y fagocitosis de las células apoptóticas (Wyllie et al. 1980; Fadok et al. 1992). Sin embargo, no fue hasta los estudios realizados con el nematodo *Caenorhabditis elegans*, cuando se describió el mecanismo de la apoptosis, revelando todo un programa genético que es ejecutado de manera ordenada (Ellis & Horvitz 1986; Ellis & Horvitz 1991). La apoptosis fue entonces reconocida como un tipo de muerte celular programada (PCD) y poco tiempo después se describió el mecanismo apoptótico en diversos modelos animales (Yuan et al. 1993), demostrando que el proceso de apoptosis que tiene lugar en mamíferos es similar al descrito en *C.elegans* aunque mucho más complejo (Degterev & Yuan 2008).

En la actualidad, podemos describir los eventos morfológicos y bioquímicos que se producen durante un prototípico proceso de apoptosis. El primer evento que se hace visible tras la iniciación del proceso de apoptosis es la condensación del citosol y la compactación de la cromatina dando lugar a unos agregados densos que se deslocalizan y desplazan hacia la membrana celular.

En segundo lugar, endonucleasas actúan sobre la cromatina, cortando el DNA en fragmentos de aproximadamente 180 pb. En paralelo, el retículo endoplasmático se dilata originando unas vesículas que tienden a fusionarse con la membrana celular, adquiriendo una morfología tipo burbuja conocida como “blebbing”.

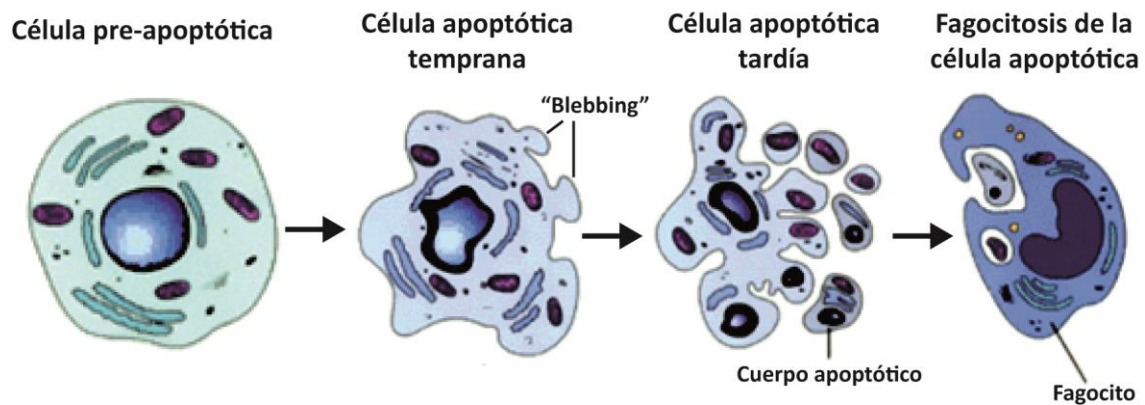


Figura 1: Etapas del proceso de apoptosis.

Finalmente, la células se divide en los denominados "cuerpos apoptóticos", los cuales son rápidamente reconocidos por los macrófagos y otras células vecinas, gracias a la exposición de señales de tipo "*eat me*" en la parte externa de la membrana celular, promoviendo su fagocitosis (**Figura 1**). De este modo, se impide la liberación de material citosólico al espacio extracelular que provocaría la inducción de una respuesta inflamatoria (Wyllie et al. 1980; Fadok et al. 1992; Taylor et al. 2008).

Entre las señales de tipo "*eat me*" encontramos, la exposición del fosfolípido fosfatidilserina (PS) en la cara externa de la membrana plasmática. La PS se encuentra estrictamente localizada en la cara interna de la membrana celular. Sin embargo, en etapas tempranas del proceso de apoptosis, se transloca a la cara externa permitiendo el reconocimiento por los macrófagos (Fadok et al. 1992; Fadok et al. 1998; Fadok et al. 2001; Schlegel & Williamson 2001). La anexina I es otra molécula que se expone en la superficie de la célula apoptótica. Además, se pueden producir modificaciones en proteínas de membrana como ICAM-3 y CD31, así como cambios en la composición de azúcares y en la carga eléctrica de la superficie celular (Henson et al. 2001; Grimsley & Ravichandran 2003).

El proceso de apoptosis como sistema de eliminación de células que deben ser reemplazadas, que no se necesitan más o que han sido irreparablemente dañadas, le proporciona un papel fundamental durante el desarrollo y mantenimiento de los tejidos. Por ello, alteraciones en el mecanismo de apoptosis se encuentran directamente relacionadas con diversas patologías.

Una **excesiva apoptosis** contribuye al desarrollo de patologías entre las que se encuentran desórdenes neurodegenerativos como el Alzheimer o el Huntington's, cardiovasculares como las

isquemia cardiaca y daños renales. Contrariamente, un **defecto en la apoptosis** supone un factor clave en el desarrollo de enfermedades autoinmunes y cáncer, favoreciendo la progresión tumoral. Por todo esto, la manipulación de la apoptosis posee un importante potencial terapéutico, que ha sido ampliamente desarrollado en el campo de la investigación del cáncer con la búsqueda de agentes antitumorales que no solo inhiban el crecimiento del tumor sino que induzcan la propia regresión de éste (Ashkenazi 2008).

1.1.1. Caspasas.

El mecanismo de apoptosis se encuentra principalmente caracterizado a nivel molecular por la activación de caspasas, responsables de todos los cambios morfológicos, mencionados previamente, que caracterizan este tipo de muerte celular (Green & Llambi 2016).

Las caspasas (*del inglés, Cysteine-dependent ASPartate-directed ProteASES*) son una familia de proteasas con cisteína en el centro activo con especificidad por los residuos de ácido aspártico, muy conservadas evolutivamente (Green 2016) y ampliamente reconocidas por su papel en el control de la muerte celular y la inflamación (Shalini et al. 2015).

I. Estructura y clasificación.

En humanos, existen 11 genes que codifican para 11 caspasas, de la caspasa 1-10 y la caspasa 14 que sólo se expresa en queratinocitos (Pistrutto et al. 2002). En células sanas, las caspasas se encuentran como enzimas precursoras en estado inactivo (zimógenos), denominadas pro-caspasas con poca o ninguna actividad enzimática (Taylor et al. 2008).

Tradicionalmente, las caspasas humanas se han dividido en 2 grandes subgrupos bien diferenciados funcionalmente: Las **caspasas pro-inflamatorias** (caspasas -1, -4, -5, -11, -12) que regulan la maduración de las citoquinas durante el proceso inflamatorio y las **caspasas pro-apoptóticas** (caspasas -2, -3, -6, -7, -8, -9, -10) las cuales inician y ejecutan el proceso de apoptosis. Las caspasas pro-apoptóticas se dividen a su vez en **caspasas iniciadoras** (caspasas -2, -8, -9, -10) y **caspasa efectoras** (caspasas -3, -6, -7). No obstante, en los últimos años, numerosas evidencias han demostrado que el papel de las caspasas no se limita a la inducción de apoptosis sino que también participan en la activación de otros tipos de muerte celular (necrosis, autofagia y piroptosis) y en procesos no relacionados con la muerte celular como la migración y proliferación celular, la regeneración de tejidos y la diferenciación (Shalini et al. 2015; Pop & Salvesen 2009; Li & Yuan 2008).

Estructuralmente, las caspasas están formadas por una subunidad grande (p20) y una subunidad pequeña (p10). El centro catalítico se sitúa en la subunidad p20 y contiene un residuo de cisteína (Cys

285), que forma parte de una secuencia de 5 aminoácidos muy conservados “QACXG”. El sitio de unión al sustrato lo forman tanto la subunidad p20 como la p10, pero el residuo determinante para la especificidad del sustrato lo contiene la subunidad p10 (Fuentes-Prior & Salvesen 2004).

La principal diferencia estructural entre caspasas iniciadoras y caspasas efectoras es que las caspasas iniciadoras poseen un prodominio N-terminal de gran tamaño (aproximadamente 100 aminoácidos), que contiene unas secuencias características de aminoácidos que permite establecer las interacciones homotípicas con otras proteínas que contengan los mismo dominios.

Estos dominios se denominan **dominios CARD** (*del inglés, CASpases-Recruitment Domain*) para las caspasas -2 y -9 y **dominio DED** (*del inglés, Death Effector Domain*) en las caspasas -8 y -10. Por su parte, las caspasas efectoras presentan un extremo N-terminal de menos tamaño (menor de 30 aminoácidos) y no contiene dominios DED o CARD (Pop & Salvesen 2009) (**Figura 2**).

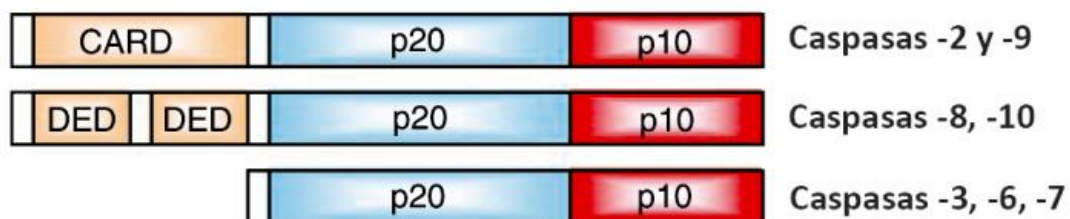


Figura 2: Estructura de las caspasas apoptóticas. Adaptado de “Caspases in apoptosis and beyond” (Li & Yuan 2008)

Las caspasas reconocen en sus sustratos una secuencia de al menos cuatro aminoácidos P4-P3-P2-P1 y cortan después del aminoácido carboxi-terminal, el P1, que es un residuo de Aspártico. El residuo P3 suele ser glutámico, y los residuos P2 y P4 son variables, por lo que la secuencia de especificidad de corte de una caspasa puede ser X-Glu-X-Asp. Los aminoácidos de la enzima que se unen al sustrato y que, por tanto, reconocen la secuencia P4-P3-P2-P1 se denomina S4-S3-S2-S1. S1 y S3 son residuos muy conservados en las diferentes caspasas, al contrario que S2 y S4, que varían significativamente entre las caspasas y originan las diferentes especificidades por el sustrato en las posiciones P2 y P4 (Li & Yuan 2008).

II. Mecanismos de activación

La activación del zimógeno se produce mediante un proceso estrechamente regulado de oligomerización y proteólisis. En primer lugar se produce una reorganización espacial de las subunidades grandes y pequeña y posteriormente se separan por proteólisis las subunidades y se elimina el prodominio, dando lugar a hetero-tretámeros de 4 subunidades dos p20 y dos p10 (**Figura 3**). Sin embargo, aunque las conformaciones de los zimógenos de las caspasas iniciadoras y efectoras son similares, los mecanismos implicados en la activación de éstas son diferentes.

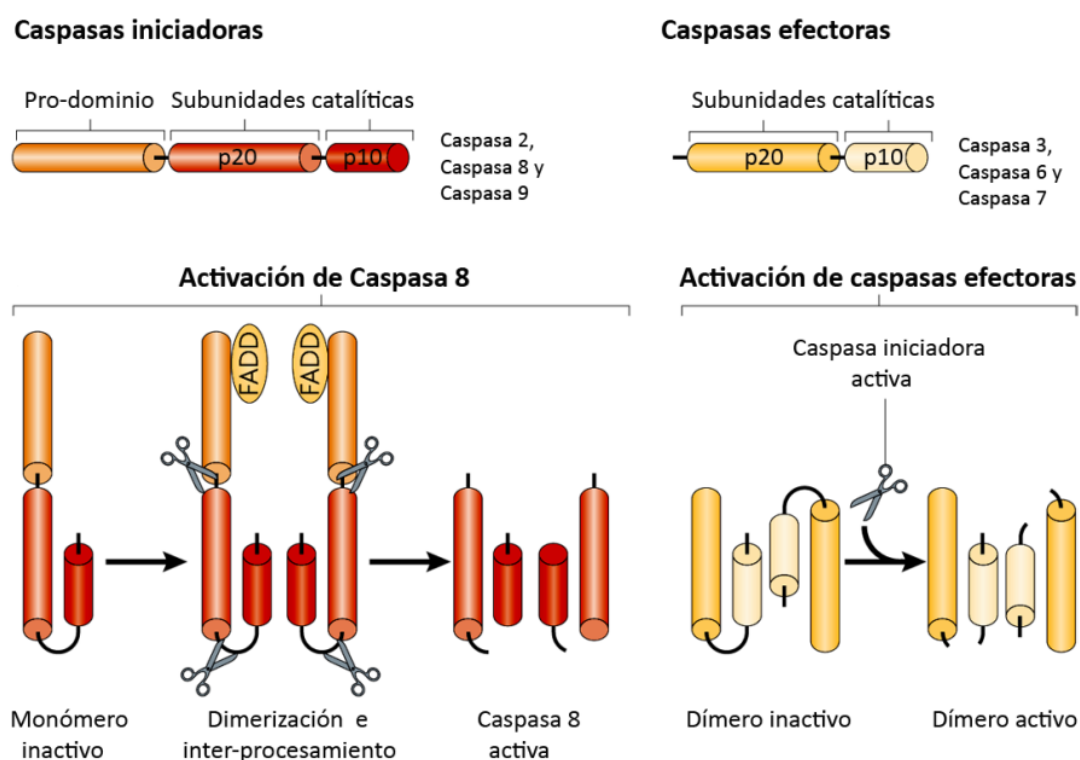


Figura 3: Estructura y mecanismo de activación de caspasa iniciadoras y efectoras. Adaptado de "Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond" (Tait & Green 2010).

Caspasas Iniciadoras: Activación por dimerización.

En estado basal, las caspasas iniciadoras son monómeros inertes que requieren una homodimerización para su activación. De este modo, tras un estímulo apoptótico, se induce el ensamblaje de las denominadas **plataformas de activación**, formadas por proteínas adaptadoras que se unen específicamente a los dominios DED o CARD de las pro-caspasas iniciadoras reclutándolas.

Cada caspasa iniciadora tiene su propia plataforma de activación. El **DISC** (*del inglés: Death Inducing Signalling Complex*) recluta y activa a la caspasa-8 y -10. El **Apoptosoma** activa a la caspasa-9, y el **PIDDosoma** está implicado en la activación de la caspasa-2 en respuesta al daño al DNA (**Figura 4**).

El reclutamiento fuerza un incremento en la concentración local de caspasas que favorece la dimerización por proximidad e induce su activación. Este modelo propone que, la dimerización induciría un cambio conformacional que permite la formación del sitio activo y la unión de los sustratos, incluso en ausencia de los cortes proteolíticos. De hecho, la proteólisis interna no activa a estas caspasas sino que es un evento secundario que favorece la estabilización del dímero activo y la señalización pro-apoptótica (Salvesen & Dixit 1999; Pop & Salvesen 2009).

Por su parte, la ausencia de proteólisis se ha relacionado con la participación de las caspasas en procesos no apoptóticos (Hughes et al. 2009; Boatright & Salvesen 2003).

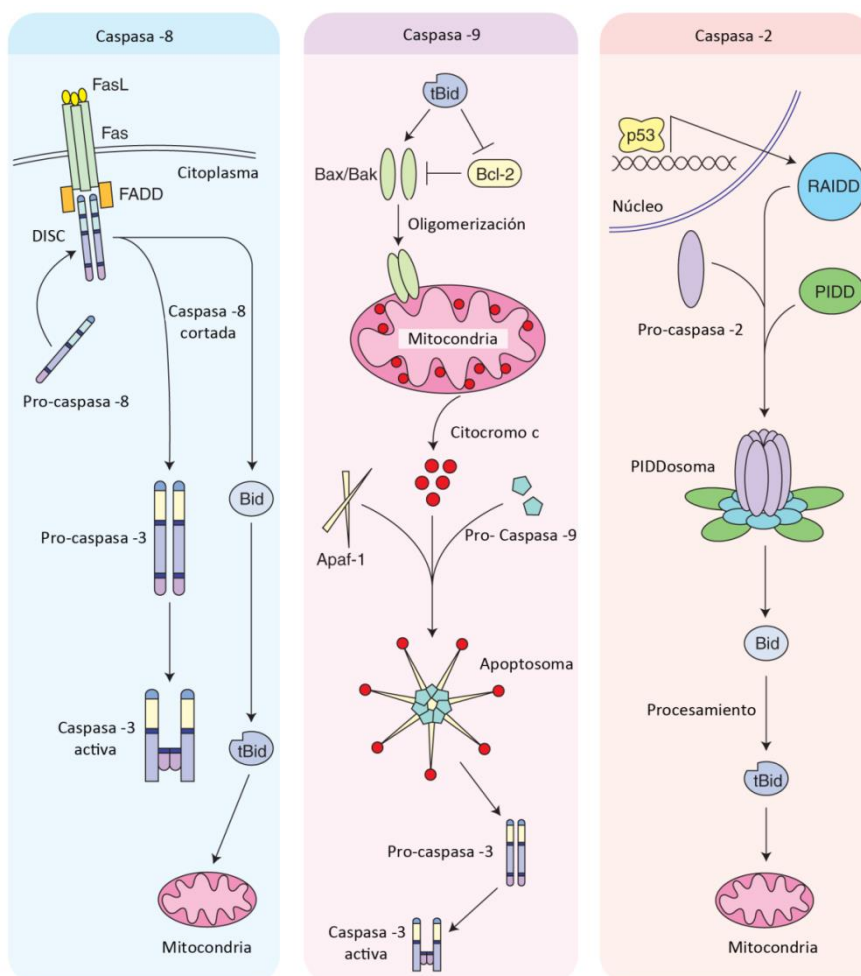


Figura 4: Plataformas de activación de las caspasa iniciadoras. Adaptado de “Cellular mechanisms controlling caspase activation and function” (Parrish et al. 2013)

Caspasas efectoras: Activación por proteólisis.

Las caspasas efectoras existen ya como homodímeros inactivos, que son reconocidas y cortadas por las caspasas iniciadoras activas (**Figura 3**), induciendo un reordenamiento estructural que hace accesible el sitio catalítico favoreciendo así la interacción con sus sustratos y la señalización apoptótica (Fuentes-Prior & Salvesen 2004; Pop & Salvesen 2009; Li & Yuan 2008)

III. Mecanismos de regulación.

Una vez activadas, las caspasas efectoras pueden cortar cientos de sustratos distintos (Crawford & Wells 2011). Sin embargo, el número de sustratos susceptibles de ser procesados por las caspasas iniciadoras es muy limitado (autoprocesamiento, BID y caspasas efectoras), lo que permite minimizar las probabilidades de inicio de un proceso apoptótico descontrolado.

Por otro lado, debido a que los procesamiento ejecutados por las caspasas son de carácter irreversible, el proceso de activación de éstas se encuentra estrictamente controlado por diferentes mecanismos que implican modificaciones post-traduccionales e interacciones con proteínas moduladoras que pueden potenciar o suprimir su actividad (Parrish et al. 2013).

Fosforilación: Se han descrito múltiples quinasas capaces de fosforilar caspasas. Por ejemplo, en respuesta a factores de crecimiento, AKT y ERK son capaces de fosforilar a caspasa-9 e inhibir su activación y en consecuencia la apoptosis o durante la mitosis la quinasa dependiente de ciclinas CDK1 puede fosforilar a la caspasa 9 en el residuo Treonina 125 e impedir la señalización de apoptosis (Li & Yuan 2008; Allan & Clarke 2009). Del mismo modo, se ha descrito que caspasa -2, en condiciones en las que la células presenta unos buenos niveles de NADPH, puede ser fosforilada por CaMKII en su dominio CARD impidiendo su asociación en el PIDDosoma. Cuando los niveles de NADPH disminuyen, caspasa-2 es desfosforilada por la proteína fosfatasa PP1, permitiendo su activación en el PIDDosoma (Nutt et al. 2009). También se han descrito numerosas quinasas capaces de fosforilar directamente a caspasa-8. CDK1 durante la mitosis fosforila a caspasa-8 en la Serina387 inhibiendo el procesamiento y activación de ésta (Matthess et al. 2010). La fosforilación por p38 MAPK inhibe la caspasa activa y protege a los neutrófilos de la muerte inducida por activación de CD95/FAS (Alvarado-Kristensson et al. 2004). Del mismo modo, la fosforilación por RSK2 promueve la degradación de caspasa -8 e inhibe la muerte inducida por FAS en células HeLa (Peng et al. 2011). Además, caspasa-8 también puede ser fosforilada directamente por tirosina quinasas. Tras estimulación del receptor de EGF con EGF, Src quinasa fosforila a caspasa 8 en la tirosina380 inhibiendo la activación de caspasa-8 y la apoptosis inducida por FAS (Cursi et al. 2006).

Ubiquitinación: Se ha descrito que tras la unión del ligando de muerte TRAIL, caspasa-8 es poli-ubiquitinada en el DISC por la E3 ubiquitin ligasa CUL3 y que esta ubiquitinización es necesaria para su completa activación (Jin et al. 2009). Por otro lado se ha descrito que la subunidad p20 de la caspasa-9 activa puede ser poli-ubiquitinada por la E3 ubiquitin ligasa XIAP, aunque no se conoce con certeza el papel de esta Ubiquitinación en el control de la progresión del proceso de apoptosis (Morizane et al. 2005). Caspasa -3, también puede ser modificada por Ubiquitinación. Recientemente se ha descrito que cIAP, ubiquitina una forma intermedia procesada de las caspasa -3, induciendo la degradación por el proteasoma de la caspasa efectora e incrementando la resistencia al ligando de muerte TRAIL (Choi et al. 2009).

Además de las modificaciones post-traduccionales, podemos encontrar proteínas capaces de interaccionar directamente con las caspasas modificando su activación o actividad enzimática y afectando positiva o negativamente la inducción de apoptosis. Es el caso de los IAPs y FLIP.

- **IAPS: Proteínas inhibidoras de la apoptosis.**

Es una familia de proteínas muy conservadas durante la evolución que pueden inhibir directamente a tanto a las caspasas iniciadoras como a las efectoras. En humanos se han descrito ocho miembros de esta familia: **NAIP, XIAP, c-IAP1, c-IAP2, survivina, ML-IAP, ILP2 y Apollon**.

Estas proteínas se caracterizan por la presencia de al menos un dominio BIR (*del inglés, Baculoviral IAP Repeat*) fundamental para la actividad inhibidora de caspasas y la interacción con otras proteínas. Algunas proteínas IAPs presentan también un dominio RING (*del inglés, Really Interesting New Gene*) que le confiere la función de E3 ubiquitin-ligasa que permite marcar a las caspasas para su degradación por el proteasoma (Riedl & Shi 2004).

XIAP es el miembro de la familia de los IAPs mejor caracterizado que posee 3 dominios BIR en su extremo N-terminal y un dominio RING en el c-terminal. XIAP inhibe por interacción específica y directa a través de sus dominios BIR a la caspasa iniciadora 9 y a las caspasas efectoras -3 y -7 (Eckelman et al. 2006). Por otra parte, se ha descrito que cIAP1 puede unirse e inhibir a la caspasa -9 activa en el apoptosoma impidiendo la activación de la pro-caspasa -3 (Burke et al. 2010).

- **cFLIP: Proteína “decoy” o trampa**

Las proteínas “decoy” o trampa conforman otro de los mecanismos de regulación de la activación de las caspasas. Son proteínas estructuralmente similares a las caspasas que compiten por la unión a las proteínas adaptadoras en las plataformas de activación. Por tanto, no actuarían inhibiendo directamente a las caspasas sino más bien impidiendo su activación.

El ejemplo más conocido es la proteína **cFLIP** (del inglés FLICE-Like Inhibitory Protein) denominada así por su elevada homología con la caspasa-8 (originalmente conocida como FLICE), con la cual compete para unirse a la proteína adaptadora FADD en el DISC, impidiendo así la formación de homodímeros de caspasa 8 necesarios para su completa activación (Pop & Salvesen 2009).

Clásicamente se ha considerado que los componentes principales que forman el DISC se encuentran en proporciones 1:1. Sin embargo, recientemente se ha descrito un modelo alternativo de la estructura de DISC, en el que las proporciones de TRAIL-R:FADD:Caspasa-8/cFLIP son 3:1:9. De este modo, las moléculas de caspasa-8 interaccionarían secuencialmente a través de sus DED, originando una cadena de activación de caspasa, cuya longitud puede variar dependiendo del tipo celular. Este modelo sugiere que se requiere más de un receptor para un reclutamiento eficiente de FADD y que múltiples procaspasas-8 deben ser reclutadas en el DISC a través de una única proteína adaptadora (Laura S. Dickens et al. 2012)

En mamíferos se han identificado hasta 13 isoformas diferentes de cFLIP generadas por splicing alternativo, sin embargo, solo tres se han detectado a nivel de proteínas. Son la isoforma larga de 55 KDa y corta de cFLIP de 26 KDa (**cFLIPL** y **cFLIPS** respectivamente) (Djerbi et al. 2001) y una tercera isoforma aislada de la línea celular Raji (**cFLIPR**) de 24KDa (Golks et al. 2005).

Estructuralmente, las 3 isoformas contienen dos dominios DED similares a los de la porción N-terminal de las caspasa-8 y -10 que permiten el reclutamiento al DISC. Por su parte, cFLIPL, posee además un dominio homólogo al de la actividad proteasa de la caspasa-8 pero catalíticamente inactivo por carecer del residuo de cisteína esencial para esta actividad (Tschopp et al. 1998; Irmeler et al. 1997).

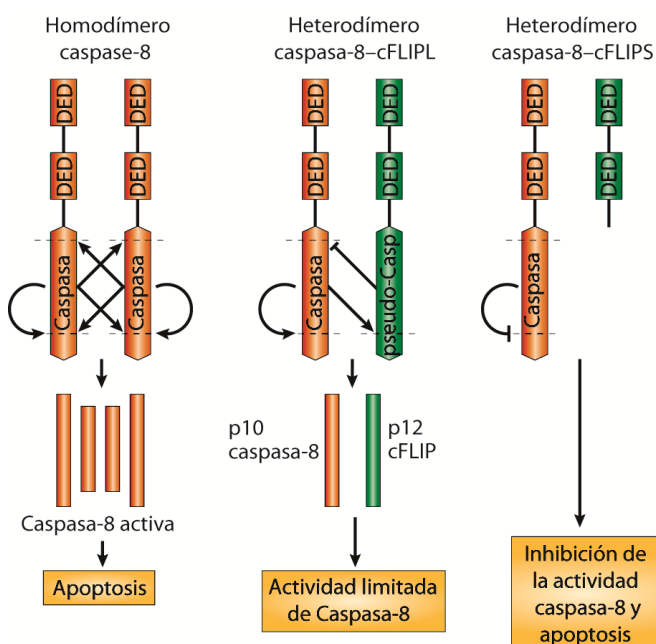


Figura 5: Regulación de la actividad caspasa-8 por cFLIP. Adaptado de "cFLIP regulation of lymphocyte activation and development" (Budd et al. 2006)

El papel anti-apoptótico de las proteínas cFLIPS y cFLIPR se encuentra bien definido (Irmeler et al. 1997; Golks et al. 2005; Krueger et al. 2001). Sin embargo, la función de cFLIPL resulta más controvertida pues el balance entre los niveles basales de esta proteína y caspasa-8, determina la señalización apoptótica o no-apoptótica derivada de la activación de los receptores de muerte (**Figura 5**). Mientras que la sobreexpresión de cFLIPL protege a las células de la apoptosis, la expresión ectópica de niveles más bajos puede favorecer la activación de caspasa 8 e inducir apoptosis (Micheau et al. 2002).

Además y en base al nuevo modelo de DISC mencionado anteriormente, recientemente se ha descrito un nuevo mecanismo que explica cómo las isoformas de cFLIP son reclutadas en el DISC y pueden controlar de manera diferencial la activación de caspasa-8 y el destino celular (Hughes et al. 2016). Así, en contraste con lo que actualmente se consideraba, las isoformas de cFLIP no estarían directamente compitiendo con la procaspasa-8 por la unión a FADD sino que en primer lugar se produciría la unión de procaspasa8 a FADD, promoviendo el reclutamiento de cFLIP vía heterodimerización con la procaspasa-8 y la activación de la procaspasa-8 dependerá de la composición del heterodímero procaspasa8: cFLIP(L)/cFLIP(S). De este modo, el **heterodímero pro-caspasa-8:cFLIP(L)**, posee cierta actividad enzimática local que permite la activación del DISC promoviendo el reclutamiento de múltiples moléculas de pro-caspasa-8 mediado por DED. En contraste, el heterodímero **heterodímero pro-caspasa-8:cFLIP(s)**, no presenta actividad enzimática y bloquea la activación de caspasa-8. Además, niveles elevados de xFLIP (L) o (S) inhiben la activación del DISC al bloquear la formación de las cadenas de caspasa-8 (Hughes et al. 2016).

1.1.2 Rutas de apoptosis.

Desde un punto de vista bioquímico, la apoptosis se define como un tipo de RCD dependiente de caspasas que puede iniciarse de manera intracelular (intrínseca) o extracelular (extrínseca).

I. Ruta apoptótica mitocondrial o intrínseca

La **apoptosis intrínseca** se produce como respuesta a un daño celular provocado por condiciones de estrés intracelular: daño al DNA, estrés oxidativo, saturación de calcio en el citosol y acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplasmático entre otros.

Independientemente del estímulo que desencadene el proceso de apoptosis intrínseca, el evento crítico del que depende esta ruta es, la **permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP, del inglés Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization)**, que provoca la pérdida irreversible del potencial de membrana mitocondrial y la liberación de un conjunto de proteínas

proapoptóticas que inducen la activación de las caspasas 9 y 3 y con ello la muerte celular (Galluzzi et al. 2012; Galluzzi et al. 2014).

Cuando se activa la ruta apoptótica mitocondrial, los miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2: Bax y Bak, crean poros en la membrana mitocondrial externa que permiten la formación de canales mitocondriales inducidos por apoptosis (MAC, *del inglés Mitochondrial apoptosis-induced channel*) que darán lugar a la MOMP y que permitirá la liberación de **citocromo-c** al citosol donde se unirá a la proteína adaptadora **Apaf-1** (*del inglés, Apoptosis protease-activating factor-1*) induciendo el reclutamiento de la **pro-caspasa-9**. La unión de estos elementos permite la conformación de un complejo multiproteico denominado **apoptosoma** (Henry-Mowatt et al. 2004), en el que se producirá la activación de la caspasa-9 que activará a las caspasas efectoras -3, -6 y -7 permitiendo la muerte de la célula (van Loo et al. 2002).

La mitocondria también puede liberar al citosol una proteína denominada **Smac/DIABLO** (*del inglés, Second Mitochondrial Activator of Caspases/Direct IAP-Binding protein with LOW PI*) que induce apoptosis de manera indirecta bloqueando la actividad de miembros de la familia de los IAPs (van Loo et al. 2002)

No obstante, los principales reguladores de la activación de esta vía son los miembros de la familia de proteínas Bcl-2. La activación de la ruta intrínseca altera el equilibrio entre los miembros pro y anti-apoptóticos de esta familia, que controlan la integridad de la membrana mitocondrial externa y con ello la apoptosis.

- **Proteínas de la familia Bcl-2**

En vertebrados, la familia Bcl-2 se divide en 2 grupos funcionalmente opuestos: Los miembros pro-apoptóticos y los anti-apoptóticos. La mayoría de las células expresan varias proteínas Bcl-2 pro y anti-apoptóticas y es la regulación de sus interacciones lo que determina que la célula sobreviva o muera por apoptosis (**Figura 6**).

Las **proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas**, cuyos principales componentes son: **Bcl-2, Bcl-w, Bcl-XL, Mcl-1 y Bfl1/A1**. Tienen la función de mantener la integridad de la membrana mitocondrial externa mediante la inhibición directa de las proteínas Bcl-2 pro-apoptóticas y se caracterizan por contener 4 dominios homólogos (BH1-4). Por lo general se localizan en la membrana externa mitocondrial, aunque también podemos encontrarlos en el citosol o en la membrana del retículo endoplasmático.

Las proteínas **Bcl-2 pro-apoptóticas** se dividen a su vez en dos subgrupos en función de los dominios BH que posean:

- Las proteínas Bcl-2 **multidominio o efectoras: Bax y Bak**. Ambas presentan dominios transmembrana que les permite insertarse establemente en la membrana mitocondrial externa y dominios estructurales que facilitan la oligomerización y la formación de poros en ésta y la MOMP.
- Las proteínas **BH3-only o iniciadoras**, que a su vez se subdividen en:
 - Sensibilizadoras: Bad, Noxa**. Únicamente tienen habilidad para interactuar con las proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas.
 - Activadoras directas: Bid, Bim y Puma**. Pueden interactuar tanto con las proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas como con las efectoras induciendo directamente la oligomerización de Bak y Bax y MOMP (Chipuk et al. 2010).

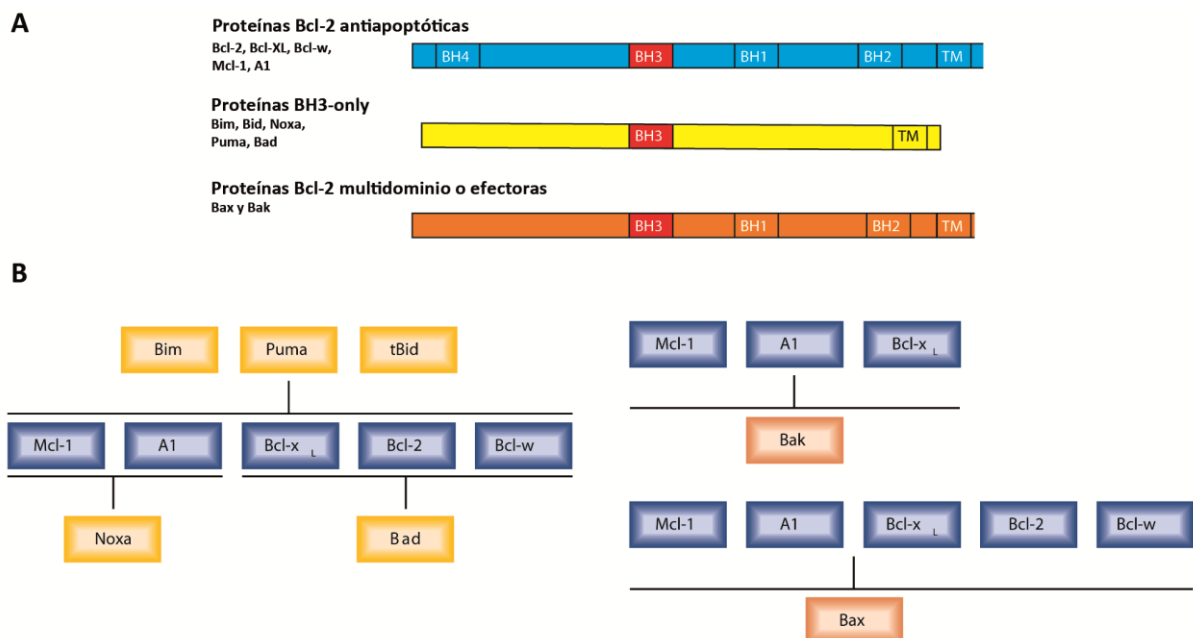


Figura 6: Estructura e interacciones entre los miembros de la familia Bcl-2 Adaptado de “Mechanisms by which Bak and Bax permeabilise mitochondria during apoptosis” y “Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cáncer and other disease” (Dewson & Kluck 2009; Strasser et al. 2011)

El evento central que permite la iniciación de la apoptosis es la activación de Bak y Bax en la membrana mitocondrial externa. Bax se encuentra mayoritariamente localizado en el citosol y Bak se encuentra inactivo y anclado en la membrana mitocondrial externa. De este modo, en respuesta a un estímulo apoptótico, se produce la homo-oligomerización y activación de Bax y Bak que conducirá a la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y a la liberación de citocromo-c al citosol.

Sin embargo, el mecanismo concreto por el cual Bax se transloca a la mitocondria y las proteínas pro-apoptóticas Bcl-2 son activadas y liberadas de los miembros anti-apoptóticos de la misma familia sigue generando controversia, existiendo 3 modelos teóricos no excluyentes que tratan de explicarlo.

Brevemente, el **modelo de activación directa** propone que ciertas proteínas BH3-only activadoras directas (Bim, Bid y Puma) interaccionan directamente e inducen cambios conformacionales en Bax y Bak activándolas de forma que las BH3-only sensibilizadoras (Bad y Noxa) podrían unirse solo a los miembros Bcl-2 anti-apoptóticos. En este modelo, la función de los miembros anti-apoptóticos inhiben la muerte celular porque se unen y sequestran a los miembros BH3-only activadores y a los efectores Bax y Bak. De este modo, los BH3-only sensibilizadores compiten por la unión a las proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas liberando así a los activadores directos para que ejerzan su función sobre Bax y Bak (Westphal et al. 2011).

Por su parte, el **modelo de activación indirecta** propone que las proteínas Bax y Bak se encuentran siempre unidas a los miembros Bcl-2 anti-apoptóticos que estarían impidiendo su activación. Tras un estímulo apoptótico, las proteínas BH3-only se unirían a los miembros anti-apoptóticos de la familia, liberando a Bax y Bak y permitiendo su oligomerización (Willis et al. 2007).

Por último **el modelo unificado**, incorpora componentes de cada modelo y propone que las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 impiden la permeabilización de la membrana mitocondrial externa de dos formas: secuestrando a las proteínas BH3-only activadoras y secuestrando a las proteínas efectoras Bax y Bak una vez activadas (Llambi et al. 2011)

II. Ruta apoptótica extrínseca

El término **apoptosis extrínseca** hace referencia a un tipo de muerte celular apoptótica que se induce en respuesta a señales de estrés extracelular que son detectadas y transmitidas al interior celular mediante receptores transmembrana específicos.

Generalmente, la unión del ligando de muerte (FAS/CD95L, TNF α y TRAIL) a sus receptores de muerte (FAS/CD95, TNFR1 y TRAIL-R(1-2) respectivamente) induce la activación de una plataforma de activación de caspasas iniciadoras que provocará en última instancia la muerte celular.

Todos estos receptores, pertenecen a la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF). Son proteínas transmembrana tipo I, estructuralmente divididas en una región extracelular (N-terminal) compuesta de dos a cuatro dominios ricos en cisteína (CRD, *del inglés cystein Rich Domain*) implicados en la unión específica con el ligando, una región transmembrana y una región intracelular (C-terminal) que posee unos dominios específicos denominados Dominios de Muerte (DD, *del inglés*

Death Domain), formados por aproximadamente 80 aminoácidos que son esenciales para la transmisión de la señal y actúan como sitios de unión que permiten el reclutamiento de las proteínas adaptadoras (Ashkenazi & Dixit 1998).

Los ligandos de muerte o ligandos de la familia de TNF, son proteínas transmembrana tipo II expresadas como monómeros. Estructuralmente, el extremo C-terminal se localiza en el espacio extracelular, y se compone de una región de 150 aminoácidos denominada dominio de homología a TNF o THD (del inglés, TNF-Homology Domain) que permite la unión al receptor (Bodmer et al. 2002).

Los receptores de la familia de TNF se encuentran fisiológicamente localizados en la superficie celular como complejos oligoméricos pre-ensamblados formando homo-trímeros. Estas interacciones se producen a través de dominios extracelulares específicos ricos en cisteínas denominados PLAD (*del inglés, Preligand Assembly Domain*) localizados en el primer CRD del receptor (Clancy et al. 2005; Chan 2007). De hecho, la eliminación de esta región PLAD, afecta a la unión de TNF con TNF-R1, lo que sugiere un papel importante del proceso de pre-ensamblaje, necesario para la correcta interacción ligando-receptor (Clancy et al. 2005; Siegel et al. 2000)

De este modo, la unión del homo-trímero de ligandos de muerte a 3 moléculas de receptor produce un cambio conformacional que permite el reclutamiento de las proteínas adaptadoras intracelulares, caracterizadas por presentar un dominio de muerte (DD, *del inglés Death Domain*) a través del cual tendrá lugar la interacción homotípica con los dominios DD de los receptores. Las proteínas adaptadoras mejor conocidas son **FADD** (*del inglés, Fas Associated Death Domain*) para FasL/CD95L/Apo1L y Apo2L/TRAIL y **TRADD** (*del inglés, TNF-R Associated Death Domain*) para TNF. Las proteínas adaptadoras, a través de su dominio DED (*del inglés, Death Effector Domain*) interaccionarán con los dominios DED de las **caspasas iniciadoras -8 y -10**, formando en el caso de FasL/CD95L/Apo1L y Apo2L/TRAIL el complejo inductor de muerte o **DISC** (*del inglés, Death Inducing Signalling Complex*) y en el caso de TNF, el complejo señalizador del receptor de TNF o **TNF-RSC** (*del inglés, TNF-receptor Signalling Complex*) (**Figura 7**) (Chinnaiyan et al. 1995; Gonzalez & Ashkenazi 2010). En estos complejos, se produce la activación de las caspasas -8 y -10 mediante procesos de corte y homo-dimerización (descritos en el apartado 1.1.1, pag 7).

Una vez en el citosol, las caspasas -8 y -10 activas van directamente a cortar y activar a las caspasas efectoras (principalmente a la caspasa-3) o a la proteína BH3-only: **Bid**, generando un Bid truncado (**t-Bid**) (Li et al. 1998; Luo et al. 1998), que va actuar como nexo entre la ruta extrínseca e intrínseca induciendo la dimerización de Bax y Bak en la superficie de la membrana mitocondrial, lo que promueve la MOMP que permitirá la liberación de citocromo-c y SMAC/DIABLO, la formación del apoptosoma y la activación de caspasa-9 (Kantari & Walczak 2011) (**Figura 7**).

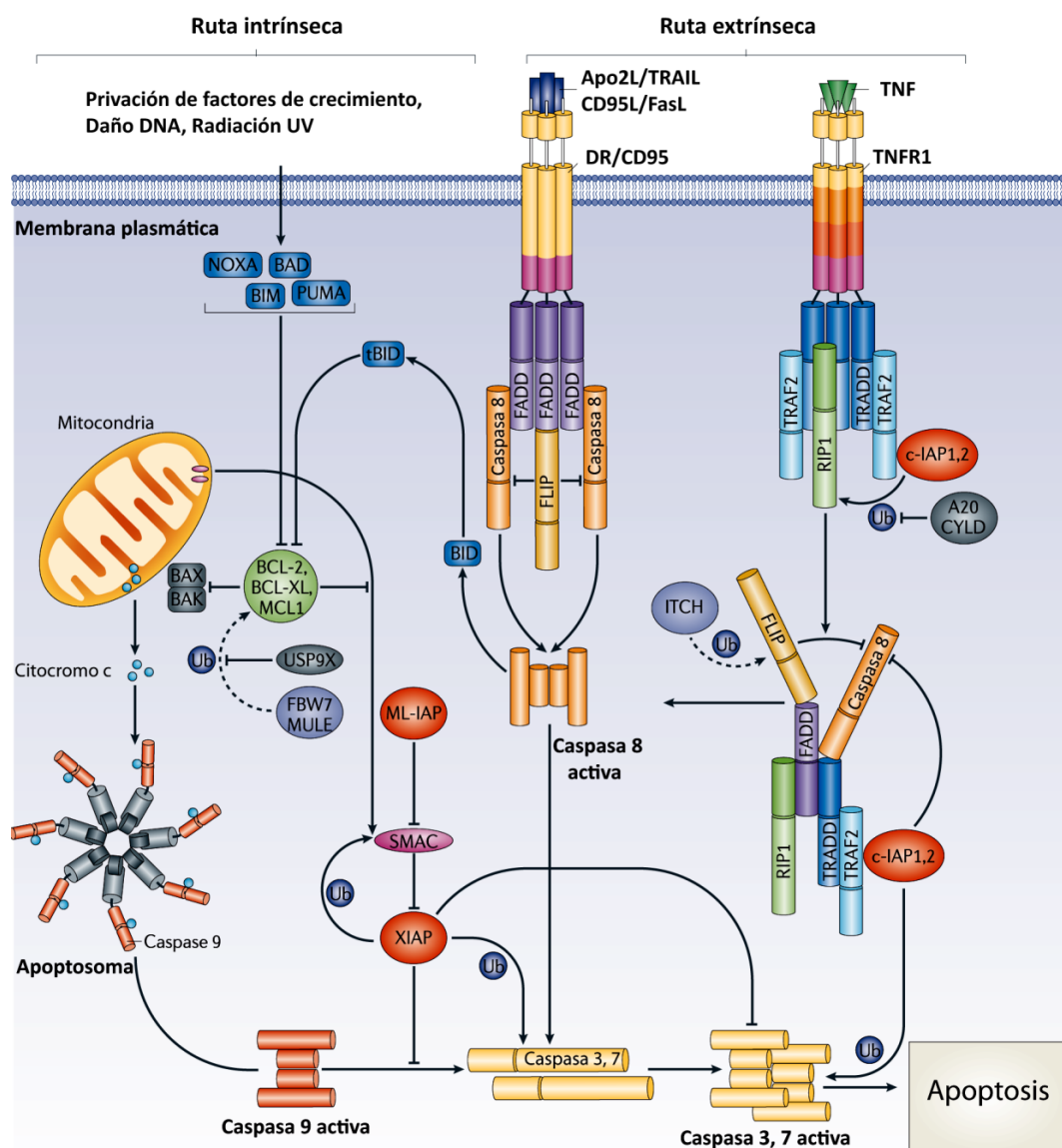


Figura 7: Rutas de apoptosis intrínseca y extrínseca. Adaptado de "Ubiquitylation in apoptosis: a post-translational modification at the edge of the life and death " (Vucic et al. 2011)

Ambos mecanismos difieren en la complejidad y en el tipo de respuesta principal que median. El complejo señalizador de TNF: TNF-RSC, señala fundamentalmente para rutas pro-inflamatorias a través de la activación de NF κ B, JNK o MAPK (Walczak 2011). Por su parte el DISC, tiene como principal función la inducción del proceso de apoptosis (Bodmer, Holler, et al. 2000; Peter 2000). Sin embargo, es importante destacar que tanto TNF-RSC como el DISC pueden inducir señalización pro-inflamatoria, apoptótica o necroptótica en función del contexto celular o de situaciones en las que las señales apoptóticas no son lo suficientemente fuertes o se encuentran inhibidas (Laura S. Dickens et al. 2012; van Raam & Salvesen 2012; Oberst & Green 2011).

Por último, se han establecido dos tipos celulares en función de cómo señalizan los receptores de muerte para apoptosis. **Las células de tipo I**, en las que la activación de la caspasa -8 en el DISC puede activar directamente a las caspasas efectoras y no requiere de la activación de la ruta mitocondrial. Por su parte, en **las células de tipo II**, la activación de la caspasa -8 en el DISC no sería suficiente y requeriría la colaboración y activación de la ruta mitocondrial para incrementar la señal y activar a las caspasas efectoras e inducir apoptosis. Esto puede deberse a una débil actividad caspasa-8 o a un elevado nivel de IAPs en la célula, que requiere de la inhibición por la proteína SMAC/Diablo (Rudner et al. 2005; Ozören & El-Deiry 2002).

1.2. Autofagia.

El término **autofagia** proviene del griego y significa comer (*fagia*) a uno mismo (*auto*) y hace referencia al proceso catabólico evolutivamente muy conservado, por el cual una célula recicla todos sus constituyentes (Yang & Klionsky 2010).

La autofagia contribuye al mantenimiento de la homeostasis celular, ya que los metabolitos generados en los lisosomas o las vacuolas como resultado de este proceso, serán de nuevo empleados como fuente de precursores y energía para la síntesis de nuevas macromoléculas (Boya et al. 2013; Ravikumar et al. 2010). Por lo que además de degradar el contenido intracelular de proteínas de vida media larga u orgánulos dañados, también en condiciones de estrés, puede formar parte de una respuesta adaptativa que permita la producción de nutrientes y energía (Yang & Klionsky 2010).

La autofagia desempeña un papel fundamental en el desarrollo de numerosos procesos fisiológicos, que abarcan desde la adaptación ante la privación de nutrientes, el desarrollo y la diferenciación celular, la degradación de estructuras aberrantes, el reciclado de orgánulos dañados, la inmunidad innata y adquirida, la supresión de tumores, el envejecimiento y la muerte celular (Mizushima et al. 2008; Levine & Kroemer 2008). Por ello, son muchos los procesos patológicos (enfermedades metabólicas, trastornos neurodegenerativos, enfermedades infecciosas y cáncer) asociados con alteraciones de la ruta autofágica. Por esta razón, se están desarrollando diferentes aproximaciones farmacológicas que permitan modular este proceso. Este es el caso de la inducción de la autofagia en procesos neurodegenerativos como el Huntington's o la inhibición de la autofagia como estrategia para el tratamiento del cáncer (Kourtis & Tavernarakis 2009; Rubinsztein et al. 2012)

En la actualidad, en función de cómo es liberada la carga en el lisosoma, distinguimos entre 3 tipos de autofagia: Macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas o CMA (**Figura 8**).

- La **macroautofagia** comúnmente conocida como **autofagia**, supone la formación de vesículas de doble membrana que secuestran contenido citoplasmático que posteriormente será liberado al lisosoma para su degradación y reciclaje (Yang & Klionsky 2010).
- La **microautofagia**, implica exponer el contenido citoplasmático directamente a la superficie de los lisosomas por invaginación, protusión y/o septación de la membrana limitante lisosomal
- Por último, en la **autofagia mediada por chaperonas o CMA**, proteínas que portan la secuencia de pentapéptidos “KFERQ” son reconocidas por la chaperona Hsp70, la cual es asociada con la proteína integral de membrana lisosomal, LAMP-2A permitiendo su oligomerización y translocación al interior del lisosoma.

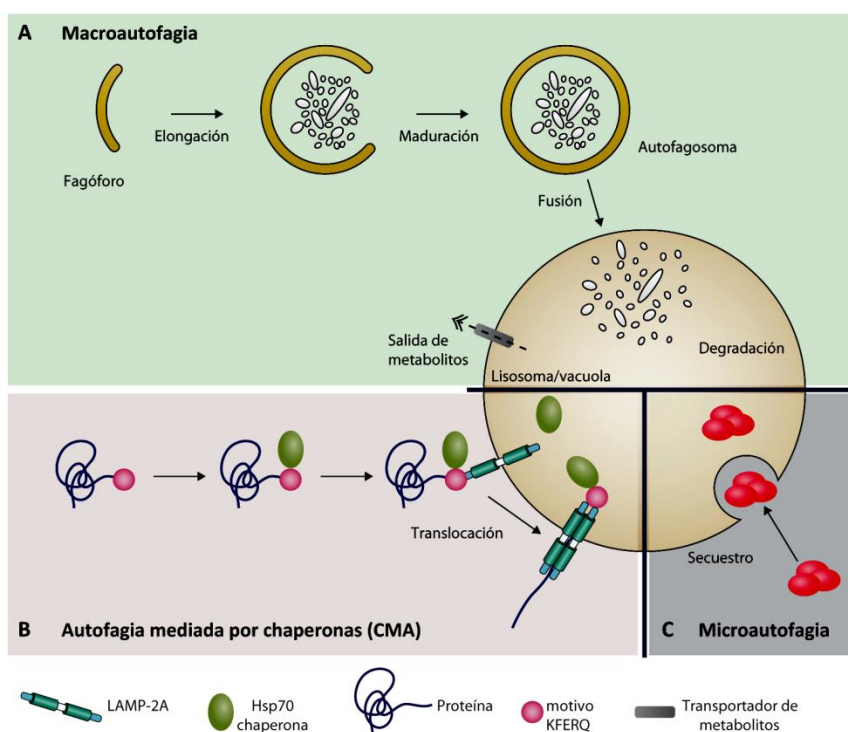


Figura 8: Tipos de autofagia.
Adaptado de “Emerging regulation and functions of autophagy” (Boya et al. 2013)

1.2.1 Mecanismo de autofagia.

La autofagia es un proceso muy conservado desde levaduras hasta mamíferos y la maquinaria bioquímica que controla y ejecuta el proceso de autofagia es extremadamente compleja y bien regulada. El descubrimiento fundamental que supuso el mayor impulso para el desarrollo de este campo, fue la identificación en levaduras de los genes que regulan la autofagia (Tsukada & Ohsumi 1993) que posteriormente serían denominados como **ATG** (*del inglés, AuTophagy related Genes*) (Yang & Klionsky 2010), que permitieron describir toda maquinaria responsable de este proceso y por lo que Yoshinori Ohsumi ha sido galardonado con el premio Nobel de Medicina en 2016.

El proceso por el cual se forman las vesículas autofágicas tiene lugar en 5 etapas muy conservadas: Iniciación o nucleación, elongación, cierre, maduración y degradación (**Figura 9**).

La primera etapa de la autofagia denominada de **Iniciación o nucleación**, comienza con la formación en la zona del Trans-Golgi, de una estructura de doble membrana lipídica denominada **Fagóforo** que comenzará a envolver el material citoplasmático (carga) que va a ser degradado. En mamíferos, se ha descrito que esta doble membrana puede proceder de distintos orígenes como membrana plasmática, Golgi, retículo endoplasmático y mitocondria (Lamb et al. 2013; Hamasaki et al. 2013) y en cualquier caso debe estar enriquecida en PtdIns3P (fosfatidilinositol 3-fosfato) necesario para el reclutamiento de proteínas autofágicas (Koyama-Honda et al. 2013).

Para la iniciación o nucleación del autofagosoma son necesarios 2 complejos: **PI3KC3 y ULK1**.

El complejo PI3KC3 (complejo III fosfoinositol 3 quinasa), está formado por Vps34, Vps15, Atg14 y Beclina-1. Vps34 es una PI3K quinasa de clase III, que fosforila al fosfatidil-inositol convirtiéndolo en PtdIns3P, que es el indicador del origen de la formación del fagóforo y el que permite el reclutamiento de las proteínas que van a dar lugar a la formación del autofagosoma temprano (Abada & Elazar 2014).

El complejo ULK1 (quinasa 1 tipo unc-51) comprende a las proteínas (FIP200, Atg13 y Ulk1). mTOR (*del inglés, Mammalian Target of Rapamycin*), es una quinasa serina/treonina perteneciente a la familia de PIKK considerado el principal sensor nutricional de la célula y uno de los reguladores negativos de la autofagia. En condiciones de estrés, mTOR se inactiva y Ulk1 es liberado, autofosforilándose y fosforilando a Atg13, al que se une permitiendo la interacción de Ulk1 con FIP200 y la inducción de la formación del fagóforo (Jung et al. 2009). Debido a que Ulk1 está localizado en la superficie de los lisosomas para interaccionar con mTOR, se ha sugerido que Ambra-1 es fosforilado por Ulk1 lo que promueve el desplazamiento del complejo ULK1 hacia el sitio de formación del fagóforo. De este modo, Ulk1 transmite la información sobre el estado metabólico de la células sensado por mTOR, hasta la maquinaria de autofagia (Di Bartolomeo et al. 2010).

La segunda etapa y tercera etapa denominadas de **elongación y cierre**, consisten en la formación completa de la estructura del autofagosoma y en ella participan fundamentalmente dos sistemas de conjugación de tipo ubiquitina fuertemente interconectados: **Atg5-Atg12-Atg16 y LC3**.

La primera reacción implica la conjugación de **Atg5-Atg12-Atg16**, Atg12 (proteína de tipo ubiquitina) es activado por Atg7 (enzima E1 ubiquitina-activadora), transferido a Atg10 (enzima E2 ubiquitina conjugadora) y finalmente conjugado con Atg5 originando el complejo Atg5-Atg12 que interaccionará con el complejo Atg16L1. Este complejo es esencial para la elongación del fagóforo, del cual se disociará cuando el autofagosoma se haya formado.

El segundo sistema supone la conjugación de la proteína asociada a microtúbulos 1 **LC3 con PE** (Fosfatidil-Etanolamina). LC3 experimenta una modificación post-traducciona que implica el corte del extremo C-terminal por la proteasa Atg4B que origina la forma LC3I citosólica que será activada por Atg7, transferida a Atg3 y junto con el sistema Atg5-Atg12-Atg16, LC3I será fosfolipidado con PE originando lo que denominamos LC3II que será insertado en la membrana del fagóforo permitiendo la expansión y cierre del mismo y originando el autofagosoma al que permanecerá asociado durante toda su vida media (Sarkar 2013).

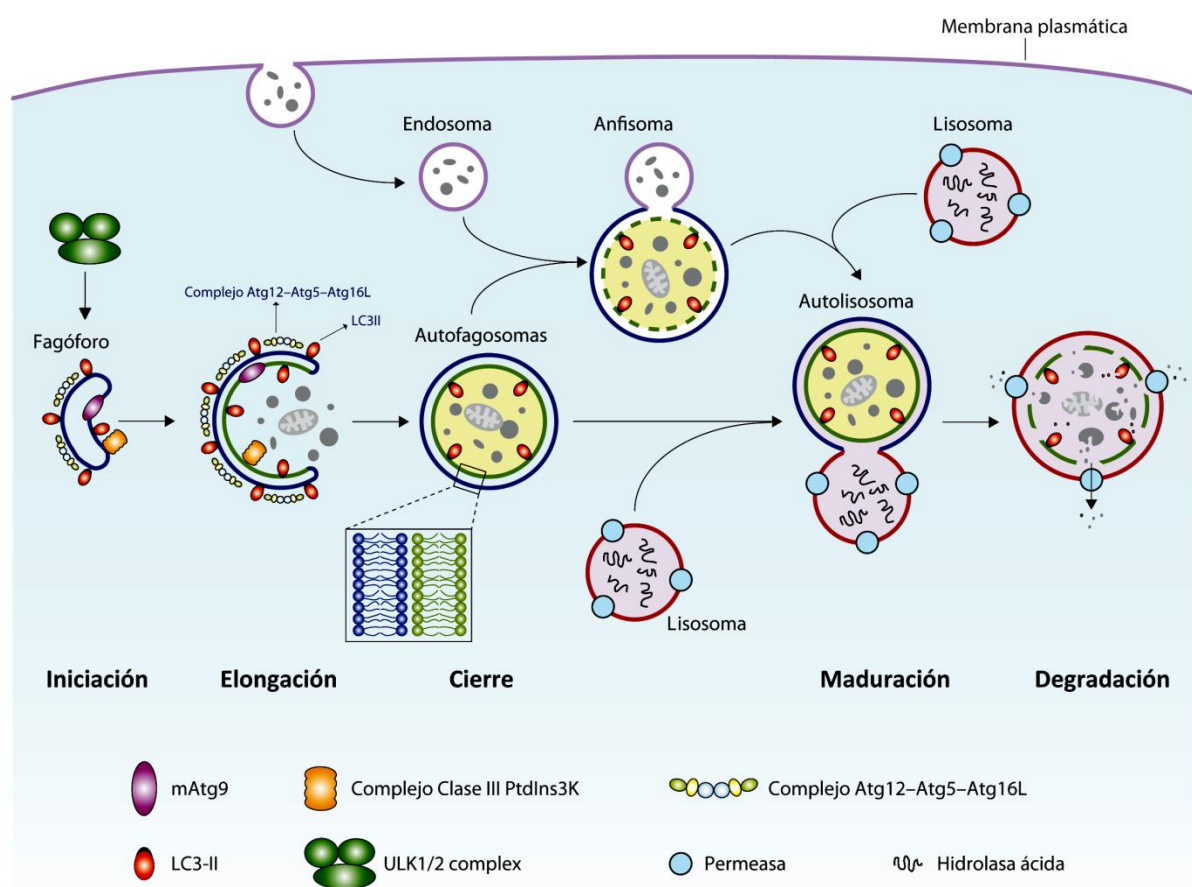


Figura 9: Mecanismo de autofagia en mamíferos Adaptado de "Eaten alive: a history of macroautophagy" (Yang & Klionsky 2010)

En la **cuarta etapa** denominada de **maduración**, implica la fusión de los dos extremos de la doble membrana constituyendo el Autofagosoma maduro. Por otro lado, una vez el autofagosoma se ha formado, puede fusionarse con endosomas tardíos (cuyo contenido también será degradado) originando los **Anfisomas**. Ambos, serán posteriormente fusionados con los lisosomas y formarán los **Autolisosomas** (Figura 9).

Estos eventos de fusión implican varias proteínas. **Rubicon** y **UVRAG** son proteínas que se unen a Beclina1 regulando la maduración de los autofagosomas y el transporte endocítico. El complejo Beclina1-Vps34-Vps15-UVRAG potencia la maduración de los autofagosomas mientras que la adición al complejo de la proteína Rubicon inhibe este proceso. Además, los eventos de fusión con los endosomas tardíos y los lisosomas están mediados por las proteínas **Rab7**, **ESCRTs** (*del inglés, Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*) y **SNAREs** (Factores de unión a proteínas receptoras sensibles a N-etanolamida)(Sarkar 2013).

Por último, la **quinta etapa** de **degradación o reciclado** que supone la degradación del contenido secuestrado en el interior del autofagosoma y que depende de proteasas ácidas lisosomales. El complejo SNARE-syntaxin 5 regula el transporte de retículo endoplasmático al aparato de Golgi a través de una ruta secretora que es esencial para la actividad de las proteasas lisosomales como las catepsinas que van a permitir la degradación autofágica (Renna et al. 2011). La inhibición de la función proteolítica del lisosoma previniendo la acidificación lisosomal (por ejemplo con Bafilomicina-A o Cloroquina) o inhibiendo la actividad proteasa (con leupeptina o E65d) retrasa la maduración del autofagosoma y la eliminación del cargo autofágico (Klionsky et al. 2012)

1.2.2 Muerte celular autofágica.

La autofagia es generalmente considerada como un mecanismo de supervivencia, por lo que su denominación como un tipo de muerte celular (muerte celular de tipo II) suele deberse a un intento fallido de superar un estrés letal (Green & Llambi 2016). Por lo tanto, en función del estímulo así como de la intensidad y duración del mismo, se produce un punto de no retorno en el cual los daños en la célula son tan importantes que es incapaz de volver a su estado fisiológico basal y como consecuencia se produce la muerte celular autofágica (Gozuacik & Kimchi 2004).

La muerte celular autofágica se caracteriza por la ausencia de la condensación de la cromatina y una masiva vacuolización (vacuolas, autofagosomas y autolisosomas) del contenido citoplasmático. Además, suele producirse una considerable movilización de lípidos en forma de vesículas o *lipid droplets* y una dilatación del retículo endoplasmático y las cisternas del aparato de Golgi (Kroemer et al. 2009).

No obstante, la existencia del término muerte celular autofágica es en la actualidad una cuestión de debate en la comunidad científica. Así, aunque no hay discrepancias en la existencia de una masiva vacuolización y adquisición de una morfología de muerte celular autofágica que puede inhibirse tanto farmacológica como genéticamente, si hay discrepancias en cuanto a los términos que se

deben emplear para hacer referencia a este tipo de muerte: **Muerte con autofagia o muerte como consecuencia de la autofagia.**

Los defensores del término **muerte con autofagia**, hacen referencia a que tanto la acumulación de una número excesivo de autofagosomas como el hecho de sobrepasar el punto de no retorno, es suficiente para provocar un colapso metabólico que va a matar a la célula. En este caso, la inhibición de la autofagia no alteraría el destino de la célula: la muerte, aunque si podría retrasarla y modificar las características morfológicas de la célula que se está muriendo. En contraposición, los defensores de la **muerte como consecuencia de la autofagia**, aseguran que muchos de los procesos de muerte que ocurren en el organismo (durante el desarrollo embrionario o la homeóstasis tisular) son consecuencia de una autofagia selectiva y directa frente a estructuras vitales de la células que hace que esta entre en apoptosis o en necroptosis, en este caso, la inhibición del proceso de autofagia si alteraría el destino celular favoreciendo la supervivencia de la célula (Kroemer & Levine 2008).

1.2.3 Conexión entre apoptosis y autofagia.

Numerosos estudios han mostrado que la apoptosis y la autofagia se encuentran interconectadas en diferentes puntos. La relación funcional entre ambos procesos es compleja en el sentido de que en función de las circunstancias, la autofagia puede constituir un mecanismo de adaptación al estrés que evita la muerte celular (suprime la apoptosis), mientras que en otros contextos, la autofagia puede constituir un mecanismo alternativo de muerte e incluso ambos procesos pueden ser inducidos en respuesta a las mismas señales iniciadoras lo que puede resultar en una combinación de apoptosis y autofagia o suponer un cambio de una respuesta a otra de forma mutuamente excluyente (Maiuri, Zalckvar, et al. 2007; Baehrecke 2005).

Todo esto implica que a nivel molecular ambos mecanismos deben compartir elementos y rutas de señalización en los que se establecen puntos de regulación, que van a permitir vincular o polarizar la respuesta celular confiriendo una ventaja evolutiva a la célula que permite responder a una señal de estrés de un modo más controlado y preciso (Rubinstein & Kimchi 2012).

Se ha propuesto que la conexión entre la apoptosis y la autofagia se produce a distintos niveles que pueden clasificarse en tres paradigmas distintos (**Figura 10**):

I. Regulación de la apoptosis por proteínas específicas de autofagia y viceversa.

En este apartado se muestra como proteínas de autofagia regulan de manera directa la ruta apoptótica por interacción con componentes de la maquinaria apoptótica y por tanto, solo la inhibición o eliminación genética de ese gen de autofagia en concreto afectará a la respuesta

apoptótica ya que en la mayor parte de los casos ni la formación de los autofagosomas ni la función autolisosomal es necesaria.

- Sistema de conjugación Atg5-Atg12.

Anteriormente, hemos descrito como Atg5 y Atg12 juegan un papel fundamental en la formación del autofagosoma. No obstante, además de su papel fundamental en autofagia, se ha descrito que estas dos proteínas también poseen de manera independiente un papel fundamental en la inducción de la apoptosis en respuesta a diferentes señales de estrés.

En células apoptóticas, **Atg5** es procesado por calpaínas, liberándose un Atg5 truncado de 24kDa es translocado a la mitocondria donde interacciona con la proteína anti-apoptótica Bcl-xl y favorece la liberación de citocromo-c (Yousefi et al. 2006). Por otra parte, se ha descrito que **Atg12** es necesario para la activación de caspasas en respuesta a diferentes estímulos apoptóticos. Atg12 presenta un dominio BH3 a través del cual puede interaccionar e inhibir a las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Mcl1 promoviendo la apoptosis (Rubinstein et al. 2011).

- Complejo Beclina-1-Vps34 y Bcl-2

Este complejo es un regulador central de la autofagia por debajo de mTOR, necesario para el reclutamiento de proteínas de autofagia en los sitios de formación del autofagosoma. La Beclina-1 fue originariamente descrita como una proteína de interacción con Bcl-2 o Bcl-xl a través de su dominio BH3 inhibiéndose la autofagia (Pattingre et al. 2005). Aun así, ni la unión Beclina-1-Bcl-2 ni la sobreexpresión de Beclina-1 induce apoptosis por neutralización, ya que a pesar de la unión, Bcl-2 mantiene su actividad antiapoptótica (Maiuri, Le Toumelin, et al. 2007; Ciechomska et al. 2009).

Además, se ha descrito que tras la inducción de apoptosis, Beclina-1 es cortada en sitios específicos por caspasas (Rubinstein & Kimchi 2012). Debido a que también son cortadas muchas otras proteínas de autofagia, se ha sugerido que el corte de la Beclina-1 se produciría como un mecanismo de inhibición de la autofagia citoprotectora en células destinadas a morir. Además, el producto C-terminal generado por el corte de la Beclina-1 se va a localizar en la mitocondria favoreciendo la liberación de citocromo-c, induciendo apoptosis en respuesta a una retirada de factores de crecimiento (Wirawan et al. 2010).

Por otro lado, se ha descrito que en condiciones basales, Bcl-2 está constitutivamente unido a Beclina-1, permitiendo tan solo unos niveles basales de autofagia. En respuesta a condiciones inductoras de autofagia, Bcl-2 se disociaría de Beclina-1 permitiendo un incremento de la autofagia (Pattingre et al. 2005). Se han descrito diferentes mecanismos implicados en la disociación de esta

interacción, como por ejemplo: la interacción competitiva de miembros BH3-only con Bcl-2, liberando a Beclina-1 para inducir autofagia (Maiuri, Le Toumelin, et al. 2007; Chang et al. 2010; Elgendy et al. 2011) o la fosforilación de Bcl-2 por JNK lo que reduce su afinidad por Beclina-1 permitiendo la activación de autofagia en respuesta a la privación de nutrientes (Wei et al. 2008).

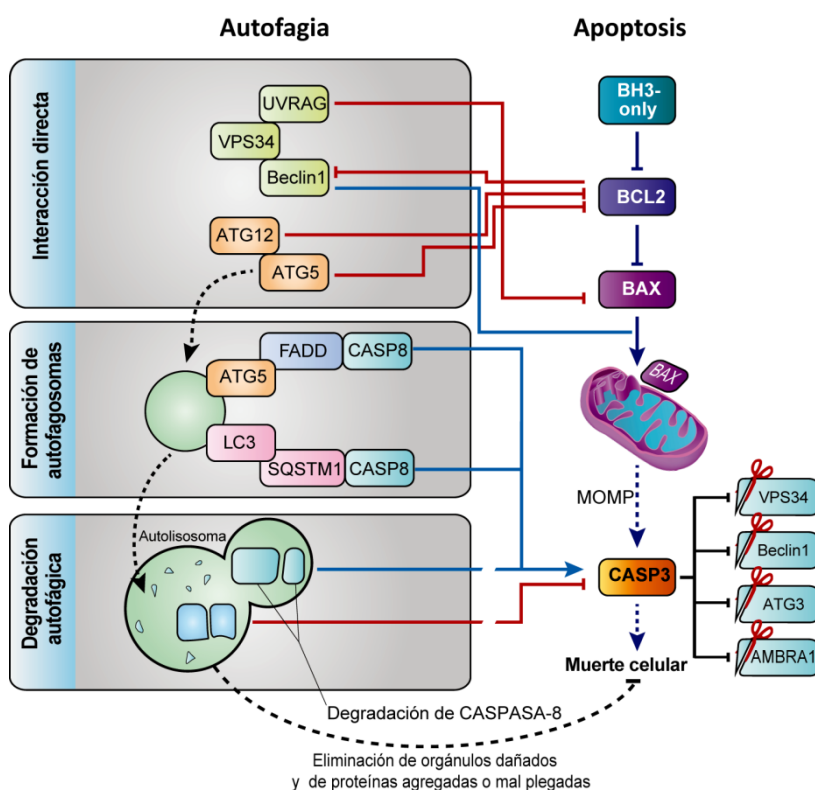


Figura 10: Mecanismos moleculares implicados en la regulación del balance entre apoptosis y autofagia. Adaptado de "Life in the balance –a mechanistic view of the crosstalk between autophagy and apoptosis" (Rubinstein & Kimchi 2012)

II. Activación de caspasas en la membrana del autofagosoma.

Resultados de distintos grupos han mostrado un mecanismo inesperado por el cual la autofagia puede contribuir directamente a la inducción de la apoptosis. Este mecanismo consiste en que las caspasas pueden ser reclutadas en los autofagosomas los cuales actuarán como plataformas intracelulares permitiendo la activación de éstas.

Es el caso de la caspasa-8, que puede ser activada en unos complejos tipo DISC ensamblados en las membranas de los autofagosomas. La activación de caspasa-8 de manera dependiente de autofagia ha sido descrita en respuesta a inhibidores del proteasoma y no requiere de ligando de muerte (Laussmann et al. 2011; Young et al. 2012).

Se han descrito 2 rutas distintas que permiten el reclutamiento de la caspasa 8 a los autofagosomas (**Figura 10**). En la primera, una caspasa-8 ubiquitinada, se une al SQSTM1/p62 a través del dominio de interacción con ubiquitina de p62 lo que permite el reclutamiento de la caspasa-8 al autofagosoma a través de una interacción directa entre p62 y LC3. En este proceso, p62 además de permitir el reclutamiento de la caspasa-8 va a promover su activación favoreciendo la auto-oligomerización de la caspasa-8 (que igualmente requerirá de la presencia de FADD). En la segunda ruta, caspasa-8 va a ser reclutada en el autofagosoma a través de la interacción entre la proteína adaptadora FADD y Atg5. De este modo, ambos escenarios implican una proteína adaptadora que media el reclutamiento de la caspasa-8 (p62 o FADD) y una proteína de autofagia que une el adaptador con el autofagosoma (p62 o Atg5) (Young et al. 2012).

III. Regulación de la apoptosis por degradación autofágica.

La capacidad del proceso de degradación por autofagia para controlar la disponibilidad de energía, la función de los orgánulos y el reciclaje de proteínas puede también regular la respuesta apoptótica.

Como ya hemos mencionado anteriormente, la autofagia presenta un papel central para la supervivencia celular en condiciones de privación de nutrientes. Por lo tanto, en ausencia de autofagia, la apoptosis inducida por este estímulo se ve acelerada (Boya et al. 2005). Este mismo mecanismo es el que se produce en respuesta a determinados agentes quimioterapéuticos, de hecho, se ha demostrado como la inhibición de la autofagia puede sensibilizar células tumorales a una gran variedad de drogas (Kanzawa et al. 2003; Kanzawa et al. 2004). En este sentido, podemos asumir que los procesos dependientes de autofagia que contribuyen al mantenimiento de la homeostasis celular podrían estar indirectamente retrasando la entrada en apoptosis a través de, por ejemplo, la eliminación de orgánulos dañados y agregados proteicos citotóxicos (Komatsu et al. 2006).

Por otro lado, la autofagia puede regular la apoptosis mediante la degradación selectiva de proteínas autofágicas. De este modo, la autofagia podría modificar el equilibrio entre proteínas pro y anti-apoptóticas regulando la inhibición o inducción de la apoptosis. Así, en células tumorales de colon, resistentes a TRAIL se ha descrito que la caspasa-8 activa es específicamente marcada para su degradación autofágica, reduciendo así sensibilidad de las células a TRAIL (Hou et al. 2010).

1.3. Necrosis programada: Necroptosis.

El proceso de muerte celular conocido como **necrosis** siempre ha sido considerado un tipo de muerte accidental (ACD), producido tras una agresión externa y que no presentaba características

morfológicas ni de apoptosis ni de autofagia. Sin embargo, durante los últimos 10 años, numerosas evidencias genéticas junto con el desarrollo de inhibidores específicos de necrosis, han permitido determinar la existencia de diferentes rutas de necrosis finamente reguladas, redefiniendo el propio concepto de necrosis y su papel en la homeostasis celular (Golstein & Kroemer 2007; Vanden Berghe et al. 2014; Feoktistova & Leverkus 2015).

La **necrosis regulada** se define como un tipo de muerte celular genéticamente controlada y morfológicamente caracterizada por una granulación citoplasmática acompañada de un incremento en el volumen celular y de los orgánulos: “oncosis”. Estas características morfológicas se observan también en otros eventos de muerte celular como la necroptosis, pyronecrosis, oxytosis, ferroptosis, Parthanatos, ETosis, NETosis y pyroptosis, que son ahora consideradas como distintos tipos de necrosis regulada (Vanden Berghe et al. 2014).

El término **necroptosis** fue inicialmente empleado para hacer referencia a un tipo de muerte celular no apoptótica, inducida por la unión específica del Factor de Necrosis Tumoral (TNF) a su receptor transmembrana (TNF-R1 o TNF-RSF1A) en condiciones en las que la activación de caspasas se encontraba inhibida (Vercammen et al. 1998). Posteriormente se describió que la necroptosis requería además de la participación de **RIPK1, RIPK3 y MLKL** y podía ser inhibida por necrostatina 1 (Nec1) inhibidor específico de la actividad quinasa de RIP1 (Smith & Yellon 2011; Green et al. 2014).

En la actualidad sabemos que la necroptosis puede ser también inducida por otros receptores de muerte (FAS y TRAIL-R) (Holler et al. 2000), receptores tipo Toll-like (TLRs) (Kim et al. 2001) e infecciones virales (Linkermann & Green 2014; Galluzzi & Kroemer 2008).

No obstante, el modelo de necroptosis mejor estudiado es el inducido por TNF α (**Figura 11**):

TNF α se une al TNF-R1 promoviendo la trimerización y formación de un complejo proteico denominado **Complejo-I**. TRADD (*del inglés, TNF Receptor Associates Death Domain Protein*) se une al dominio de muerte intracelular de TNF-R1 y recluta a la proteína quinasa RIP1 (RIPK1) a través de los dominios de muerte presentes en ambas proteínas. La proteína adaptadora TRAF2 (*del inglés, Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor 2*), también es asociada al complejo y recluta a las E3 ubiquitin ligasas c-IAP1 y c-IAP2 responsables de la poliubiquitinación de RIP1 que permite la activación de NF- κ B que inducirá la transcripción de genes anti-apoptóticos como FLIP, IAP-1 e IAP-2 (**Figura 11A**) (Linkermann & Green 2014; Vanden Berghe et al. 2014; de Almagro & Vucic 2015).

Por otro lado, si la activación del TNF-R1 coincide con la ausencia de c-IAPs (por antagonistas de IAP), con una inhibición de la traducción o con la deubiquitinización de RIP1 por la deubiquitinasa CYLD, RIP se translocará a un segundo complejo citoplasmático (**Complejo-II**).

El complejo II se compone de la proteína adaptadora FADD, pro-caspasa 8 y FLIP. La isoforma larga de FLIP (FLIP L) y la pro-caspasa 8 forman un heterodímero que procesa e inactiva a las proteínas RIPK1, RIPK3 y CYLD previniendo la inducción de necroptosis e induciendo apoptosis (**Figura 11B**) (O'Donnell et al. 2007; Bertrand et al. 2008; Feoktistova et al. 2011).

Sin embargo, si no se produce una activación completa de caspasas o se bloquea su actividad, la proteína quinasa RIP3 es reclutada en un complejo de tipo microfilamentoso y se forma lo que denominamos **necrosoma**, responsable de la inducción de la muerte celular necroptótica. Una vez el necrosoma se ha formado, RIP1 y RIP3 comienzan una serie de auto y cros-fosforilaciones que van a permitir la unión y fosforilación de la pseudoquinasa MLKL (*del inglés, Mixed Lineage Kinase-domain Like*), eventos esenciales para la necroptosis (**Figura 11C**) (Cho et al. 2009; He et al. 2009; Sun et al. 2012).

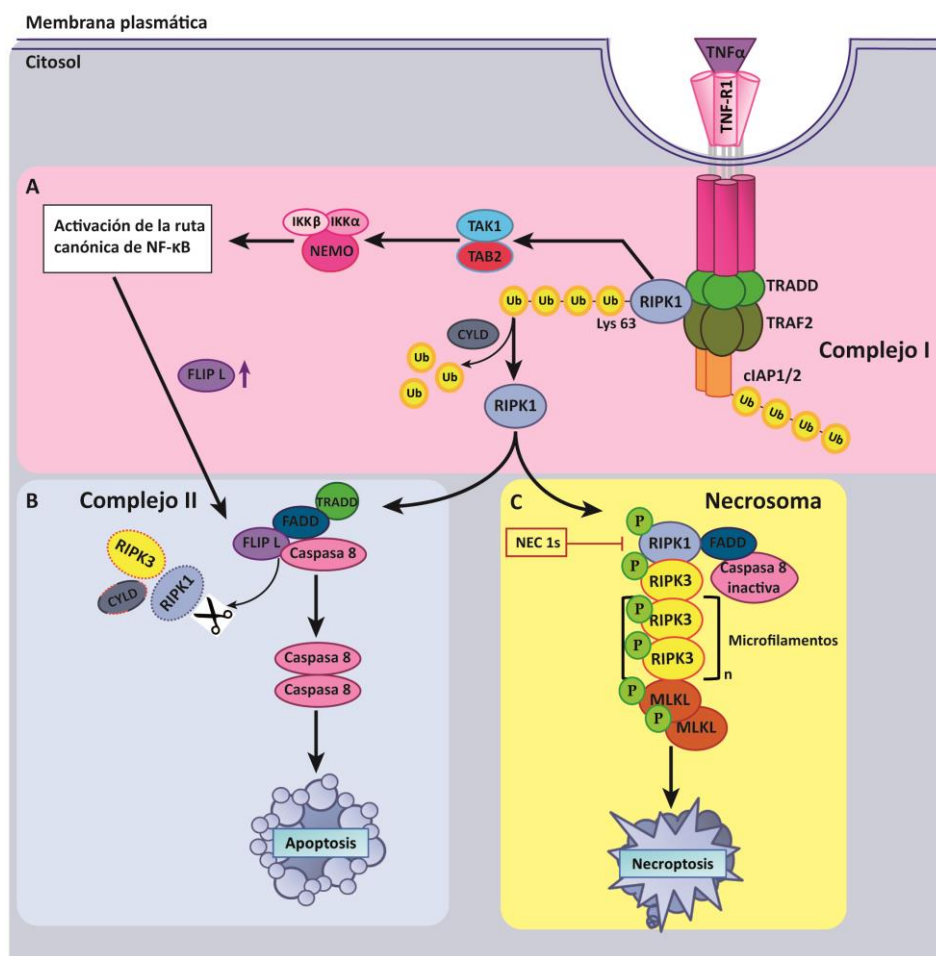


Figura 11: Necroptosis mediada por TNFα: El prototipo de necrosis regulada

2. APO2L/TRAIL.

La molécula endógena de APO2L/TRAIL fue descubierta a mediados de los años 90 por dos laboratorios independientes: El laboratorio de Ashkenazi en Genentech (Pitti et al. 1996) y el laboratorio de Ray Goodwin's en Immunex (Wiley et al. 1995).

APO2L/TRAIL (*del inglés, APO2 ligand/TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand*) es un ligando de muerte, miembro de la familia de citoquinas del factor de necrosis tumoral (TNF), inicialmente descrito por su capacidad para inducir apoptosis de manera independiente del receptor de Fas y TNF (Wiley et al. 1995; Pitti et al. 1996).

Es una proteína transmembrana de tipo II, que de manera similar a los otros miembros de la familia de TNF, puede ser procesada proteolíticamente en su dominio extracelular, liberando un fragmento soluble de 24 KDa a la matriz extracelular, que mantiene su actividad (Mariani & Krammer 1998).

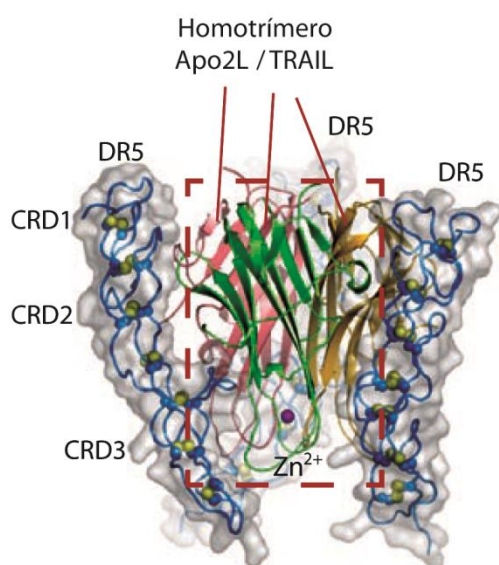


Figura 12: Estructura cristalina del trímero APO2L/TRAIL unido a tres moléculas de TRAIL-R2/DR5 Adaptado de "Directing cáncer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonists" (Ashkenazi 2008)

La estructura cristalina de TRAIL interaccionando con TRAIL-R2 muestra que (**Figura 12**), TRAIL forma un trímero y cada molécula de receptor interacciona con la fisura formada por dos monómeros del trímero (Hymowitz et al. 1999; Lawrence et al. 2001). Por tanto, la forma activa de TRAIL es un homotrímero, que puede unirse a tres receptores simultáneamente y que a diferencia de otros miembros de la familia de TNF, presenta un átomo de zinc central, que interacciona no-covalentemente con tres residuos de cisteína localizados en la posición 230 de cada monómero de TRAIL y que es esencial para su estabilidad, solubilidad y bio-actividad (Bodmer, Meier, et al. 2000; Trabzuni et al. 2000; Hymowitz et al. 2000).

TRAIL fue inicialmente caracterizado como un ligando de muerte, capaz de inducir selectivamente apoptosis en un amplio rango de células tumorales sin afectar a las células normales y que además, tanto en solitario como en combinación con quimioterapia, mostraba una significativa actividad antitumoral en modelos murinos xenoinjertados de cáncer.

Asimismo, a diferencia de TNF- α y FasL, la administración sistémica de TRAIL es capaz de inducir apoptosis en células tumorales sin ninguna toxicidad en órganos o tejidos normales (Ashkenazi et al. 1999; Walczak et al. 1999).

Sin embargo, las razones de esta diferencia de sensibilidad, así como su papel fisiológico no se encuentran todavía completamente esclarecidas. Numerosos estudios con ratones deficientes en APO2L/TRAIL o TRAIL-R2/DR5 (único receptor pro-apoptótico en ratones) muestran que la señalización de TRAIL no es necesaria para el desarrollo embrionario del ratón (Sedger et al. 2002; Diehl et al. 2004; Cretney et al. 2002), pero si presentan una mayor sensibilidad a desarrollar distintos tipos de enfermedades autoinmunes experimentales como, artritis inducida por colágeno, diabetes inducida por estreptotocina y encefalomiелitis autoinmune experimental, lo que sugiere que la señalización de TRAIL posee un importante papel en la inducción y regulación de la respuesta inmune (Lamhamedi-Cherradi et al. 2003; Anel et al. 2007). Todo esto correlaciona con que, aunque el RNA mensajero de TRAIL está presente en la mayoría de los tejidos, la proteína se expresa principalmente en células del sistema inmune (Mariani & Krammer 1998), como linfocitos, monocitos, células dendríticas y células natural killer (NK) dependiendo del estado de estimulación (Kayagaki et al. 1999; Fanger et al. 1999; Griffith et al. 1999).

En cuanto al papel de APO2L/TRAIL en la progresión tumoral se ha observado que los ratones deficientes en APO2L/TRAIL o TRAIL-R2/DR5 son más susceptibles a desarrollar tumores inducidos o xenoinjertados (Sedger et al. 2002; Cretney et al. 2002; Finnberg et al. 2008). Además, aunque estos ratones a edad temprana no desarrollan tumores de manera espontánea, si se ha observado la formación de éstos en ratones deficientes en APO2L/TRAIL una vez superada la vida media (Zerafa et al. 2005). Por otro lado, se ha atribuido un papel para TRAIL, más que en el control de los tumores primarios, en el desarrollo y control de las metástasis. En este sentido, se ha definido el papel de TRAIL en la supresión experimental mediada por NK de metástasis en hígado (Takeda et al. 2001) y además, se ha demostrado que ratones deficientes en TRAIL-R2 son más sensibles a desarrollar metástasis en nódulos linfáticos en un modelo de carcinoma de piel escamoso (Grosse-Wilde et al. 2008). Sin embargo, recientemente se ha descrito que la eliminación específica de TRAIL-R2 en células tumorales de ratón en un modelo de NSCLC (*del inglés, Non Small-Cell Lung Cancer*) y PDAC (*del inglés Pancreatic Ductal AdenoCarcinoma*) inducido por KRAS, reduce el crecimiento del tumor, las metástasis directas y prolonga la supervivencia al inhibir la migración, proliferación e invasión de las células tumorales (von Karstedt et al. 2015). Estos datos parecen indicar que el papel de TRAIL-R1 y TRAIL-R2 podría depender del contexto oncogénico y que por tanto aún no se ha definido por completo el papel de TRAIL endógeno en el control tumoral.

2.1. Receptores de TRAIL.

Los receptores transmembrana de TRAIL son proteínas de tipo I, que pertenecen a la familia de receptores de TNF y, al igual que TRAIL, se expresan constitutivamente en la mayoría de los tejidos y tipos celulares. En humanos, el homotrímero de TRAIL puede unirse específicamente a cuatro tipos de receptores transmembrana: TRAIL-R1/DR4, TRAIL-R2/DR5, TRAIL-R3/DcR1 y TRAIL-R4/DcR2, y con menor afinidad, al receptor soluble: Osteoprotegerina (OPG) (**Figura 13**) (Truneh et al. 2000; Almasan & Ashkenazi 2003).

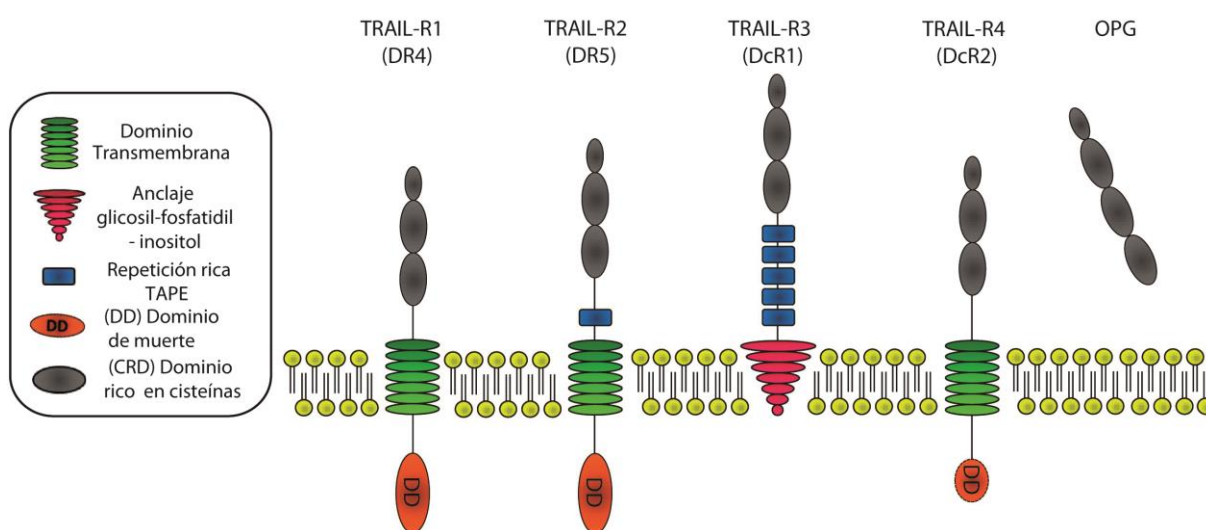


Figura 13: Receptores de TRAIL. Adaptado de “Getting TRAIL back on track for cancer therapy” (Lemke et al. 2014)

De entre todos ellos, sólo **TRAIL-R1/DR4** (Guohua Pan et al. 1997) y **TRAIL-R2/DR5** (Walczak et al. 1997; Schneider, Bodmer, et al. 1997) son capaces de **transmitir la señal apoptótica**. TRAIL-R1/DR4 y TRAIL-R2/DR5 comparten un 58% de homología y hasta el momento no se han identificado diferencias funcionales entre ambos. Se caracterizan por presentar en su región intracelular el dominio de muerte (DD), necesario para la señalización apoptótica. La contribución relativa de cada uno de los receptores pro-apoptóticos de TRAIL, parece depender del tipo celular y en general células tumorales transformadas y tejidos cancerígenos expresan mayores niveles de receptores proapoptóticos que células y tejidos normales, aunque no siempre existe una correlación entre la expresión de los receptores y la sensibilidad a TRAIL (Ichikawa et al. 2001) ya que, la funcionalidad de los receptores, puede también ser regulada por modificaciones post-traduccionales o eventos subcelulares.

Existen además dos isoformas de TRAIL-R2, TRAIL-R2(L) y TRAIL-R2(S) cuya única diferencia radica en 23 aminoácidos localizados entre los dominios CRDs y el dominio transmembrana. Sin embargo, aún no se ha determinado si estas variantes poseen papeles distintos o adoptan distintos mecanismos de señalización (Wang & Jeng 2000).

Por otro lado, **TRAIL-R3/DcR1** (Sheridan et al. 1997; MacFarlane et al. 1997; Degli-Esposti, Smolak, et al. 1997) que carece del dominio citoplasmático y transmembrana (se ancla a la membrana a través de un dominio glicosil-fosfatidil-inositol) y **TRAIL-R4/DcR2** (Degli-Esposti, Dougall, et al. 1997; Marsters et al. 1997) por poseer un DD truncado, son incapaces de señalizar para apoptosis. Sin embargo, en base a experimentos de sobreexpresión, ambos pueden interaccionar con el ligando, inhibiendo la señalización apoptótica de TRAIL y actuando como **receptores decoy o trampa** (Mérino et al. 2006; Morizot et al. 2011). Además, se ha propuesto que TRAIL-R4/DcR2, puede inhibir la apoptosis inducida por TRAIL mediante la formación de complejos inactivos e independientes de ligando con TRAIL-R2 o a través de la señalización de rutas de supervivencia como NFκB (Clancy et al. 2005; Kelley et al. 2005; Gómez-Benito et al. 2007). No obstante, el papel fisiológico de TRAIL-R3 y TRAIL-R4 sigue siendo algo controvertido y su función podría depender del tipo celular. Es el caso de las líneas tumorales hepáticas humanas Hep3B y la variante resistente a TRAIL HepG2-TR, en las que hay una expresión significativa de los receptores decoy que no afectan a la apoptosis inducida por TRAIL (Ganten et al. 2004).

Por último, la **osteoprotegerina (OPG)** cuya función principal es la regulación de la remodelación ósea a través de la inhibición de otro miembro de la super-familia de TNF: RANKL (*del inglés, Receptor Activator NFκB Ligand*) (Lacey et al. 2012) pero que también se ha descrito su capacidad para interaccionar con TRAIL (Emery et al. 1998). De hecho, la aplicación exógena de OPG recombinante inhibe la apoptosis inducida por TRAIL. Sin embargo, en condiciones fisiológicas, la OPG presenta una baja afinidad por TRAIL, que junto con el hecho de que en modelos de ratón deficientes en TRAIL o TRAIL-R2 no se altere ningún signo del metabolismo óseo, sugiere que es poco probable que la interacción TRAIL-OPG juegue un papel fisiológico in vivo (Cretney et al. 2002; Lemke et al. 2014).

2.2. Señalización apoptótica de TRAIL.

La unión del homotrímero de TRAIL a sus receptores pro-apoptóticos TRAIL-R1/-R2, localizados en la superficie celular formando trímeros a través de sus dominios PLAD, induce la agrupación de los receptores en complejos de alto peso molecular, la cual permite el reclutamiento de la proteína adaptadora FADD a través de la interacción homotípica entre los dominios de muerte (DD-DD) de los

receptores y FADD. Seguidamente, FADD recluta a la procaspasa-8/-10 a través de interacciones homotípicas entre los dominios efectores de muerte (DED-DED) presentes en ambas proteínas, formándose así el complejo inductor de muerte (DISC).

Una vez reclutadas en el DISC, las moléculas de procaspasa-8/-10 forman homodímeros que inducen un cambio conformacional que expone sus sitios proteolíticamente activos produciéndose la activación completa mediante procesamiento auto-catalítico (ver el apartado, Caspasas Iniciadoras: Activación por dimerización, pág. 7). La liberación del DISC de los homodímeros activos permite el corte y activación de los sustratos intracelulares, así como la activación de las caspasas efectoras induciéndose el proceso de apoptosis (Lemke et al. 2014; De Miguel et al. 2016).

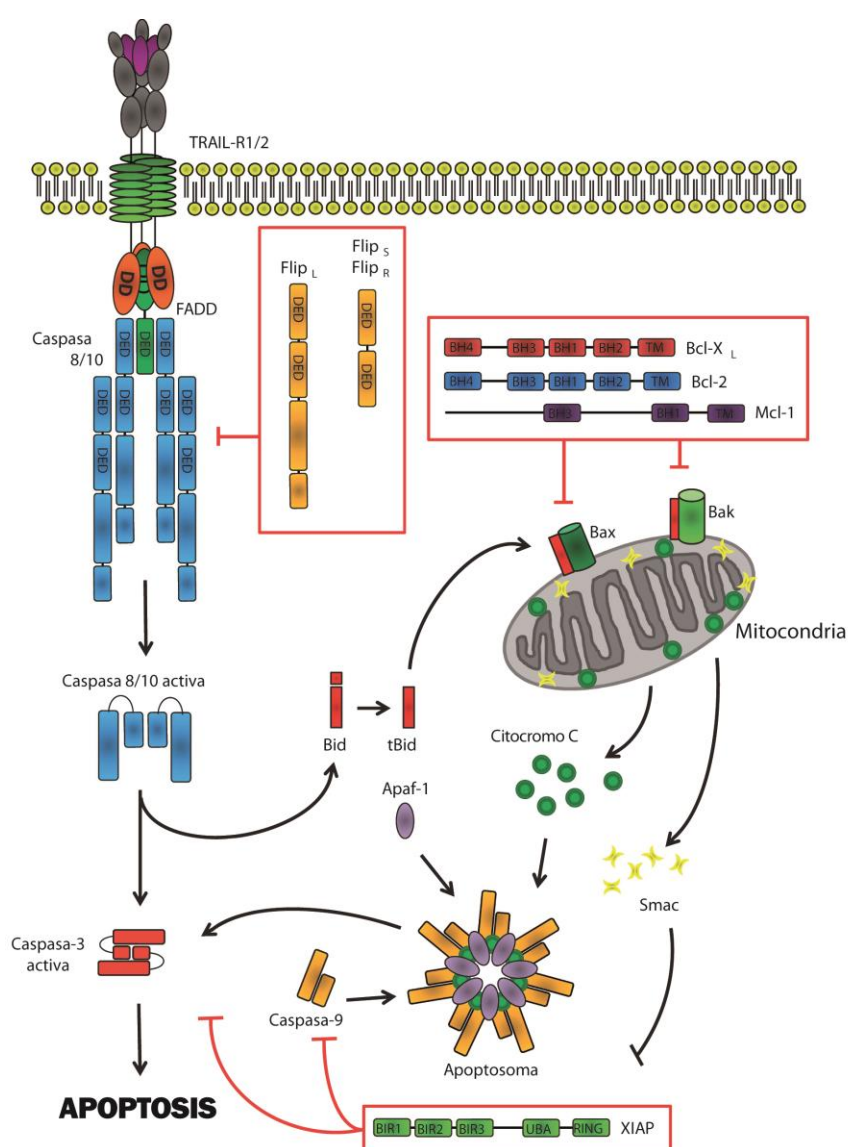


Figura 14: Señalización de apoptosis inducida por TRAIL.
Adaptado de "Getting TRAIL back on track for cancer therapy" (Lemke et al. 2014)

TRAIL puede activar ambas rutas apoptóticas (intrínseca y extrínseca) dependiendo del tipo celular. De este modo, en **células de tipo I**, la activación del DISC es fuerte y lo suficientemente estable para

inducir una fuerte activación de la caspasa-8 que es suficiente para cortar y activar la caspasa-3 efectora e inducir apoptosis, mientras que en **células de tipo II**, la activación de caspasa-3 inducida por el DISC es incompleta o insuficiente y se requiere además la activación de la ruta mitocondrial.

Para ello, caspasa-8 activa, va cortar a la proteína BH3-only Bid, generando un Bid truncado (tBid) que se translocará a la mitocondria donde junto con los miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2: BAK y BAX inducirá la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP) y la liberación al citosol de factores pro-apoptóticos como citocromo-c y SMAC/DIABLO. El citocromo-c junto con Apaf-1 y procaspasa-9 formará el apoptosoma, donde se producirá la activación de caspasa-9 que cortará y activará otras caspasas efectoras entre las que se incluye caspasa-3 y se inducirá la apoptosis (**Figura 14**) (Lemke et al. 2014).

2.2.1 Regulación de la apoptosis inducida por TRAIL.

La apoptosis inducida por TRAIL se encuentra meticulosamente regulada, garantizando así que la maquinaria apoptótica tan solo se inicie en las condiciones apropiadas. En células y tejidos normales, este mecanismo garantiza la homeostasis normal del organismo y del mismo modo, las células tumorales se aprovechan de esta maquinaria, para evitar la apoptosis.

La apoptosis inducida por TRAIL se encuentra regulada específicamente a distintos niveles:

- **A nivel de membrana:** Controlando la expresión y localización de receptores pro-apoptóticos (TRAIL-R1 y TRAIL-R2). Mediante la expresión de los receptores no apoptóticos (TRAIL-R3/-R4 y OPG) que pueden modular la sensibilidad a TRAIL.
- **A nivel del DISC:** cFLIP compite con caspasa-8 por la unión a FADD
- **A nivel de la mitocondria:** Por miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xl, Mcl1) que inhiben a los miembros pro-apoptóticos Bax/Bak impidiendo la MOMP (ver apartado 1.1.2, apartado proteínas de la familia Bcl-2)
- **A nivel de las caspasas efectoras:** Mediante la interacción directa de XIAP con las caspasa -3, -7, -9, inhibiendo su actividad pro-apoptótica.

I. Regulación a nivel de membrana.

La cascada de señalización de las caspasas se encuentra enormemente influenciada por los eventos que se producen en la membrana. Anteriormente ya mencionamos que el ratio entre los niveles de expresión de los receptores TRAIL-R1/-R2 y TRAIL-R3/-R4 puede modular la sensibilidad a TRAIL mediante el secuestro del ligando disponible. Sin embargo, independientemente de los receptores

de muerte o de los niveles de expresión de caspasa -8, diversos factores pueden contribuir a la eficiencia del DISC y a la apoptosis (Pennarun et al. 2010).

La presencia de los receptores pro-apoptóticos de TRAIL en los **lipid-rafts** constituye un mecanismo esencial para la señalización eficiente de TRAIL. Los lipid-rafts son microdominios localizados en la membrana celular que se caracterizan por presentar una alta concentración en esfingomielina, esfingolípidos y colesterol (Simons & Ikonen 1997; Brown & London 1998). TRAIL solo o en combinación con diversos agentes quimioterapéuticos estimula la formación del DISC mediante la relocalización de las proteínas del DISC en los lipid-rafts y la alteración de éstos provoca una pérdida de la sensibilidad a TRAIL. De hecho, en células sensibles, la desorganización de los lipid-rafts con M β CD (metil- β ciclodextrina) inhibe tanto el corte de la caspasa-8 como la muerte inducida por TRAIL, mientras que en células NSCLC resistentes, TRAIL no recluta a caspasa-8 y FADD en los lipid-rafts sugiriendo que la localización en los lipid-rafts correlaciona con la formación de un DISC más eficiente y funcional. De la misma manera, se ha observado que la formación del DISC también se puede producir fuera de la zona de lipid rafts, relacionándose entonces con la señalización de rutas de supervivencia como NF κ B y ERK (Song et al. 2007; Ouyang et al. 2011; Marconi et al. 2013). Sin embargo, aún no se conoce con exactitud el mecanismo molecular responsable de la agrupación de los receptores de muerte de TRAIL en los lipid-rafts (**Figura 15A**).

Por otro lado, muchas células tumorales entre las que se incluyen las células tumorales de mama expresan significativos niveles de TRAIL-R1/-R2, pero no parece existir una correlación entre los niveles totales de expresión de receptor y la sensibilidad de las células a TRAIL, lo que sugiere la existencia de **modificaciones post-traduccionales** que van a regular la funcionalidad de los receptores. Entre las modificaciones que se han descrito encontramos la **O-glicosilación y la S-palmitoilación**. TRAIL-R1 y TRAIL-R2 pueden ser N- u O-glicosilados en función del tipo celular, modulando de este modo la sensibilidad de las células a TRAIL (Jin et al. 2004; Wagner et al. 2007). Se ha descrito que la O-glicosilación incrementa la estabilidad de los receptores en la membrana, previniendo la endocitosis y facilitando la translocación de los receptores agrupados para el ensamblaje del DISC y la activación de la caspasa-8. De esta manera, un incremento en los niveles de proteínas glicosiladas correlaciona de forma directa con la sensibilidad a TRAIL de células NSCL, colorrectales, pancreáticas y de melanoma (Wagner et al. 2007; Wu et al. 2012). Además, se ha descrito un posible sitio de N-glicosilación en TRAIL-R1 (G Pan et al. 1997) que no se encuentra conservado en TRAIL-R2 (Sheridan et al. 1997). La N-glicosilación regula el transporte de TRAIL-R1 a la superficie celular, alterando el “clustering” de los receptores e impidiendo su activación (Jin et al. 2004; Yoshida et al. 2007). Por su parte, La S-palmitoilación puede inducir la localización de TRAIL-R1 en los lipid-rafts y homo-oligomerización (Rossin et al. 2009) (**Figura 15B**).

Por último, los niveles de expresión en la membrana de los receptores pro-apoptótico de TRAIL dependen fundamentalmente de dos procesos. Por un lado, del **tráfico o de la translocación de proteínas desde el sistema trans-golgi (TGN; del inglés Trans-Golgi Network) hasta la membrana plasmática**. Un mal funcionamiento de esta ruta resultará en una reducción en los niveles de receptores de muerte en la superficie celular y un incremento en la localización en el citosol, TGN y perímetro nuclear (Símová et al. 2008; Kojima et al. 2011; Zhang et al. 2000).

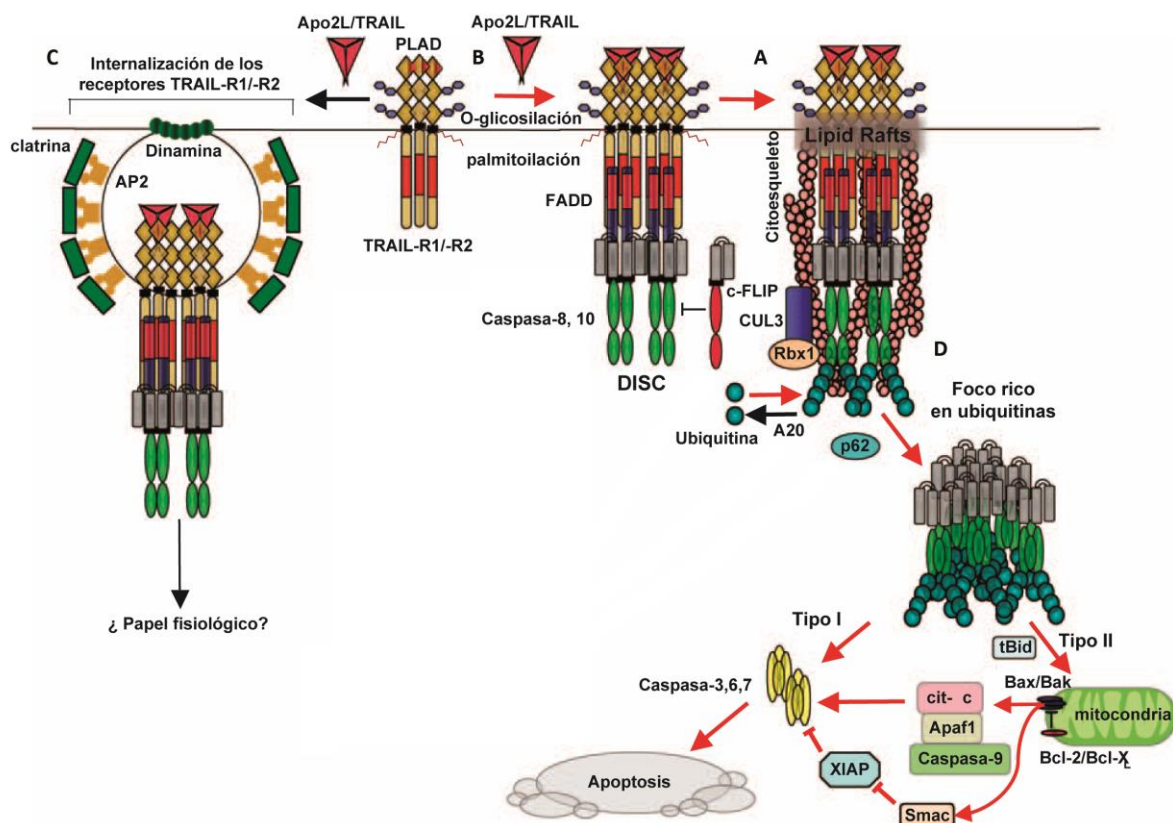


Figura 15: Mecanismos de regulación de la apoptosis inducida por TRAIL. Adaptado de “New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL” (Gonzalvez & Ashkenazi 2010)

No obstante, el incorrecto funcionamiento del tráfico de los receptores a la membrana plasmática es un proceso que requiere todavía de una investigación más profunda. Por otra parte, la **internalización** de los receptores TRAIL-R1/-R2 también se encuentra críticamente implicada en la regulación de la señalización de TRAIL. Tanto TRAIL-R1 como TRAIL-R2 se internalizan rápidamente en respuesta a la unión del ligando a través de un mecanismo dependiente de dinamina, sin embargo y en contraste con la señalización de TNFR1 y FAS, la internalización del complejo ligando-receptor no es necesaria para la formación del DISC y la inducción de apoptosis por TRAIL. De hecho, se ha

observado que la activación de los receptores de muerte de TRAIL, alteran la maquinaria de endocitosis a través del procesamiento dependiente de caspasas de componentes de la maquinaria endocítica, inhibiendo la endocitosis y potenciando la activación de caspasa-8 en el DISC (Austin et al. 2006; Kohlhaas et al. 2007) (**Figura 15C**).

II. Regulación a nivel del DISC.

El principal regulador de la señalización de TRAIL a nivel del DISC es cFLIP. Tal y como describimos anteriormente en el apartado 1.1.1 (subapartado, cFLIP: Proteína “decoy” o trampa (pág. 10)), las tres isoformas generadas por splicing alternativo del RNAm de cFLIP son reclutadas en el DISC a través de sus dominios de muerte. No obstante, la regulación de la actividad de las caspasa-8 depende de las cantidades relativas de cFLIP-L, cFLIP-S y caspasa-8.

Aunque **cFLIP-S** puede inhibir la activación de la caspasa-8 compitiendo por ésta por la unión a FADD, el papel de **cFLIP-L** es más complejo y parece depender de sus niveles de expresión. Cuando la expresión de cFLIP-L es elevada, éste puede actuar de manera similar a cFLIP-S e inhibir por completo la apoptosis (Irmeler et al. 1997). Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que el heterodímero cFLIP-L/caspasa-8, además de conservar cierta actividad enzimática, también puede inducir una actividad proteasa más localizada frente a determinados sustratos en comparación con la actividad del homodímero de caspasa-8, regulando de esta manera la especificidad de sustrato (Micheau et al. 2002; Boatright et al. 2004). De acuerdo con esto, posteriormente se describió que el heterodímero caspasa-8/cFLIP-L es crucial para la regulación negativa de la necroptosis (Oberst et al. 2011; Pop et al. 2011).

En cuanto al papel de cFLIP-L en células no transformadas, nuestro grupo ha descrito que la expresión de cFLIP-L protege a las células epiteliales de mama de la apoptosis inducida por TRAIL previniendo la activación de caspasa-8. Además, la inhibición de la expresión de cFLIP-L induce un incremento en los niveles de expresión de TRAIL-R2 suficientes para inducir apoptosis espontáneamente (Yerbes et al. 2012). Estos resultados junto con los observados en células tumorales ponen de manifiesto el complejo papel de cFLIP en la regulación de las rutas de señalización inducidas por TRAIL.

Por otro lado, se ha descrito la **ubiquitinación** como mecanismo regulador de la completa activación de la caspasa-8 en respuesta a TRAIL. La inmunoprecipitación del complejo TRAIL-DISC y posterior espectrometría de masas reveló la presencia de la subunidad E3 de la ubiquitin ligasa Cullin-3 (CUL3) y de la deubiquitinasa (DUB) A20 en el DISC (Jin et al. 2009). De esta forma, en células sensibles a TRAIL se ha observado que la activación de los receptores de muerte permite la formación y

translocación del DISC a la zona de los lipid-rafts, donde la ligasa CUL3 interacciona con caspasa-8 e induce su poli-ubiquitinación de manera dependiente de RBX1 (Ring-Box1). La poli-ubiquitinación en la región c-terminal de la caspasa-8 permite el reclutamiento de la proteína de unión a ubiquitina p62, que dirige la caspasa-8 del DISC a un foco rico en ubiquitinas (**Figura 15D**).

La agregación de la caspasa-8 en estas estructuras de alto peso molecular promueve el corte auto-proteolítico y la liberación de la caspasa-8 activa al citoplasma, permitiendo la activación de las caspasas efectoras y la apoptosis (Jin et al. 2009)

2.3. Señalización no apoptótica de TRAIL.

Además de la activación canónica de apoptosis dependiente de caspasas, TRAIL puede activar en células tumorales resistentes y células normales no transformadas rutas no canónicas implicadas en la proliferación, inflamación, supervivencia e incluso metástasis. Sin embargo, se desconoce el sentido biológico de la activación de estas rutas (Palacios et al. 2014).

Entre las rutas no apoptóticas inducidas por TRAIL se incluye la activación de diversas rutas de quinasas como RIP1, IKK/NFκB (IkappaB kinase), JNK (Jun N-terminal kinase), MAPK-p38, ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase) p13K-AKT y Src (Azijli et al. 2013).

Los eventos moleculares tempranos que permiten la señalización no canónica de TRAIL son complejos y todavía no se conocen en profundidad. No obstante, experimentos de co-inmunoprecipitación han determinado la existencia de un **segundo complejo de señalización (Complejo-II)**, que se forma posteriormente al ensamblaje del DISC primario. Este complejo secundario intracelular que mantiene los componentes del DISC: **FADD, caspasa8 y FLIP** puede reclutar adicionalmente a las proteínas **RIP1, TRAF2 y NEMO (IKKγ)** y se ensambla fuera de la zona de lipid-rafts (**Figura 16**) (Varfolomeev et al. 2005). Además, el complejo-II también puede contener a TRADD y a caspasa-10 (Jin & El-Deiry 2006).

La activación de las rutas pro-inflamatorias y de supervivencia controlada por NFκB fue una de las primeras señales no canónica descritas inducida por TRAIL. Tanto TRAIL-R1 como TRAIL-R2 pueden activar NFκB de manera dependiente de TRADD y RIP-1 (Chaudhary et al. 1997; Schneider, Thome, et al. 1997). NEMO, que se encuentra formando parte del complejo secundario, puede reclutar a IKKα/β permitiendo la fosforilación y consiguiente degradación proteasomal del IκB, produciéndose así la liberación y acumulación de NFκB, que será translocado al núcleo donde inducirá la transcripción de genes anti-apoptóticos como cFLIP, Bcl-xl, Mcl-1 y cIAPs, cuya actividad podría inhibir la apoptosis inducida por TRAIL (Wajant 2004). Sin embargo el papel de NFκB no se limitan tan solo a ser un

regulador negativo de la apoptosis inducida por TRAIL, sino que también parece presentar un papel en células resistentes a TRAIL, en las que se ha observado que la activación de NF κ B inducida por TRAIL puede promover supervivencia, proliferación e invasividad (Ehrhardt et al. 2003; Ishimura et al. 2006) y la inhibición de la actividad de NF κ B in vitro sensibiliza a células tumorales a TRAIL (Ravi et al. 2001) y media la regresión tumoral in vivo (Luo et al. 2004), aunque esto no es un efecto general en todos los tipos celulares (Ganten et al. 2005).

Asimismo, TRAIL también puede activar las rutas de MAPK: JNK, p38 y ERK (Falschlehner et al. 2007) y esta activación podría requerir la activación de caspasas y la formación del complejo secundario, sin embargo, aún no se conoce el mecanismo molecular por el que TRAIL induce esta activación a través de caspasa-8 (Song & Lee 2008).

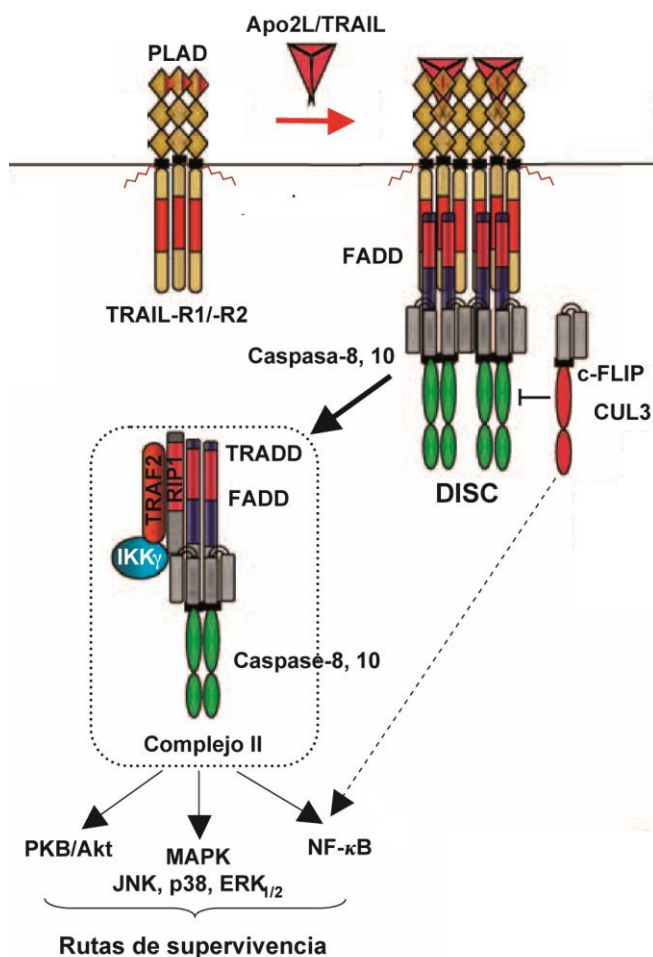


Figura 16: Complejo secundario de TRAIL. Adaptado de "New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL" (Gonzalez & Ashkenazi 2010)

La activación de JNK y p38 por TRAIL parece presentar efectos opuestos en función del tipo y del contexto celular por lo que todavía no se le ha atribuido ninguna importancia fisiológica remarcable (Azijli et al. 2013). Por su parte, la activación de ERK se encuentra relacionada generalmente con efectos anti-apoptóticos. En este sentido se ha observado como la activación de ERK bloquea la

apoptosis inducida por TRAIL a través de la inhibición de la activación de caspasa-8 y del procesamiento de Bid (Soderstrom et al. 2002) o de la asociación de tBid (Ortiz-Ferrón et al. 2006) con la mitocondria sin afectar a la formación del DISC. TRAIL también induce la fosforilación de ERK en líneas tumorales humanas de cáncer de mama y la inhibición de la ruta de ERK potencia la apoptosis inducida por TRAIL (Lee et al. 2006).

Además, en células humanas de glioma resistentes a TRAIL se ha observado un incremento en la proliferación celular en respuesta a un tratamiento con TRAIL, que podría estar relacionado con la activación de ERK1/2. En este sentido, la inhibición de ERK reduce la proliferación celular pero no estimula la sensibilidad de las células a TRAIL, mientras que el silenciamiento de cFLIP previene la activación de ERK, la proliferación y favorece la sensibilización parcial a la apoptosis inducida por TRAIL (Vilimanovich & Bumbasirevic 2008).

En células MCF10A, TRAIL también puede promover la inducción de autofagia tanto en monocapa como en cultivos en 3D, participando en la formación del lumen de los acinos (Mills et al. 2004) y el mecanismo de activación de autofagia por TRAIL en estas células, implica la activación dependiente del DISC de la proteína TAK1 que promueve la activación de AMPK produciéndose la inhibición de mTOR, señal inductora de autofagia (Herrero-Martín et al. 2009).

Por último, se ha descrito que TRAIL también puede inducir necrosis dependiente de RIPK1 en condiciones de acidez extracelular cuando la activación de caspasa-8 se encuentra inhibida, lo que podría representar una importante ruta de muerte celular en la terapia basada en TRAIL para el tratamiento de tumores sólidos (Meurette et al. 2007).

2.4. APO2L/TRAIL como terapia antitumoral.

El santo grial de la terapia frente al cáncer, es encontrar un agente que elimine específica y eficientemente células tumorales con poca o ninguna repercusión en células normales. Una de las características más atractivas de la activación de la apoptosis en el tratamiento del cáncer es su potencial para inducir la regresión del tumor. Sin embargo, muchos agentes pro-apoptóticos no discriminan entre células tumorales y normales, lo que implica un importante riesgo de padecer efectos colaterales. Esto es lo que ocurre con tratamientos tradicionales contra el cáncer: quimioterapia y radioterapia, que inducen apoptosis de manera secundaria al daño provocado en componentes vitales de la célula. Aun así, estos tratamientos no siempre son capaces de erradicar el tumor debido a que las células tumorales, durante el proceso de transformación oncogénica pueden adquirir mutaciones que les permiten bloquear los mecanismos de inducción de apoptosis, lo que provoca el fracaso de estas terapias. Es el caso de la proteína supresora de tumores p53, mutada en

el 50% de los tumores lo que provoca la inhibición de la activación de la ruta mitocondrial en la que se basan los tratamientos antitumorales convencionales (Ashkenazi 2008).

En este sentido, el desarrollo de estrategias que activen la ruta extrínseca mediada por receptores de muerte, supone una interesante alternativa terapéutica para el tratamiento contra el cáncer, ya que por un lado los receptores pro-apoptóticos se encuentran expresados en la mayoría de las células tumorales y por otro que oncogenes como Myc y Ras, parecen incrementar la apoptosis al favorecer la interacción de las rutas intrínseca y extrínseca (Nieminen et al. 2007)

Desde el descubrimiento de TRAIL (Pitti et al. 1996; Wiley et al. 1995) y debido a su potencial para inducir apoptosis específicamente en células tumorales, se han dedicado numerosos esfuerzos para intentar usar esta molécula en la clínica. El primer intento consistió en desarrollar una forma soluble del ligando que comprendiera el dominio extracelular de la proteína endógena y una estructura homotrimérica, que fue capaz de inducir apoptosis en células tumorales sin citotoxicidad en células normales como hepatocitos y que además tanto en monoterapia como en combinación con quimioterapia mostró actividad antitumoral en modelos murinos de cáncer (Walczak et al. 1999; Ashkenazi et al. 1999).

En ensayos clínicos, principalmente se han empleado dos estrategias basadas en el sistema TRAIL/TRAIL-R (**Figura 17**) (Lemke et al. 2014).

- I. El uso de una forma soluble de TRAIL humano recombinante (rhTRAIL) también conocido como Dulanermin®.
- II. Anticuerpos agonistas monoclonales dirigidos específicamente a uno de los dos receptores pro-apoptóticos de TRAIL: PARAs (*del inglés Pro-Apoptotic Receptor Agonists*) (**Figura 17**) (Ashkenazi et al. 2008; Wiezorek et al. 2010).

El uso de la forma soluble de TRAIL (rhTRAIL) tiene la ventaja de activar al mismo tiempo los dos receptores pro-apoptóticos de TRAIL, lo que maximiza las posibilidades de inducir apoptosis, sin embargo, también cabe la posibilidad de que los receptores anti-apoptóticos de TRAIL, secuestren este ligando. Por esta razón, el uso de los anticuerpos agonistas frente a TRAIL-R1 o TRAIL-R2 parecía en un primer momento ser la estrategia más prometedora.

Tal y como hemos mencionado anteriormente, en algunos tipos celulares, es uno de los receptores pro-apoptóticos el que más eficientemente induce apoptosis por lo que potenciar específicamente la activación de ese receptor permitiría obtener un mejor rendimiento evitando interacciones superfluas y la inducción de una señalización no apoptótica. Además, los anticuerpos monoclonales presentan un perfil farmacocinético mucho más estable, con una vida media más larga que requeriría

una menor frecuencia en la aplicación de las dosis. Sin embargo, a pesar de sus prometedores datos en estudios preclínicos, la actividad de estos anticuerpo agonistas in vivo parece restringida, debido a la necesidad de promover el “cross-linking” y la agregación para inducir apoptosis (Adams et al. 2008), por lo que mejorar la estequiometría y geometría de los PARAs es crucial para la inducción de una apoptosis efectiva y selectiva. (Lemke et al. 2014; Ashkenazi 2015).

Por otro lado, y de nuevo a pesar de los prometedores informes pre clínicos, los resultados clínicos de la forma soluble de TRAIL (rhTRAIL) fueron decepcionantes. En este sentido, los resultados obtenidos en términos de seguridad y tolerancia fueron positivos, sin embargo muchas células tumorales primarias mostraron resistencia al tratamiento con TRAIL (Eramo et al. 2005; Koschny et al. 2007; Nguyen et al. 2001). Además, en el caso de la aplicación de rhTRAIL en monoterapia es importante tener en consideración la señalización no apoptótica de TRAIL, la cual se ha demostrado puede ser aprovechada por las células tumorales. Además, se ha demostrado que el sistema TRAIL/TRAIL-R puede promover el desarrollo de metástasis en diversos modelos (Trauzold et al. 2006; von Karstedt et al. 2015; Fritsche et al. 2015; Hoogwater et al. 2010).

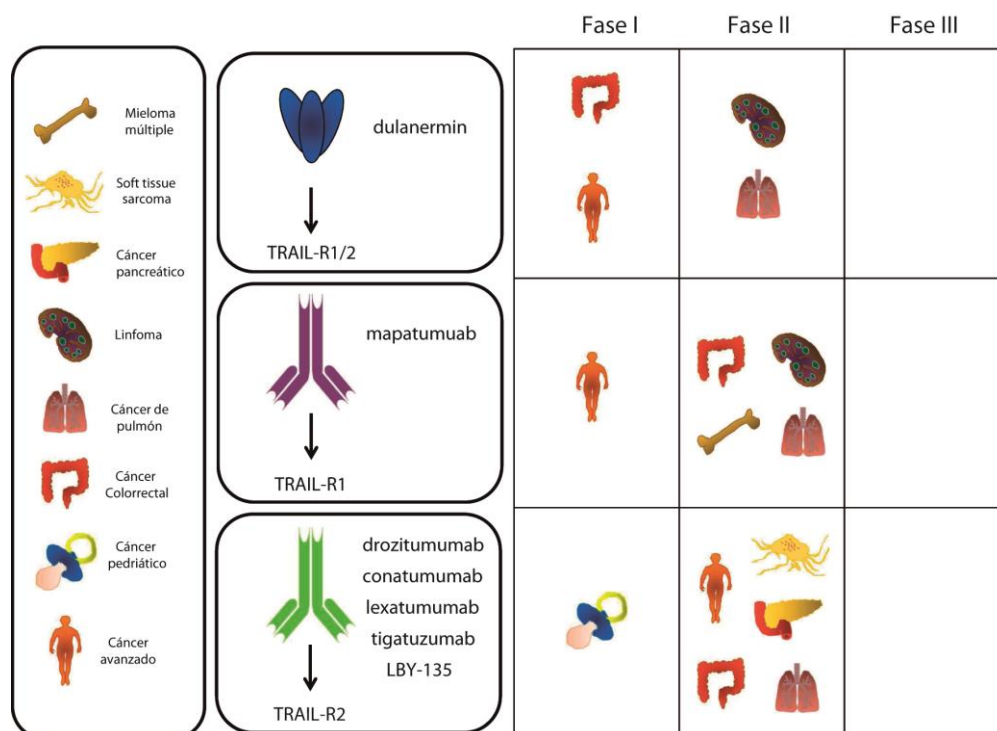


Figura 17: Progreso de los anticuerpos agonistas frente al sistema TRAIL en ensayos clínicos. Adaptado de “Getting TRAIL back on track for cancer therapy” (Lemke et al. 2014)

De esta manera para evitar los efector pro-tumorigénicos del sistema TRAIL/ TRAIL-R y eliminar la resistencia de las células tumorales a la apoptosis inducida por TRAIL, se ha propuesto la combinación de TRAIL con una amplia variedad de agentes sensibilizadores, algunos de los cuales ya están siendo testados in vivo sin provocar toxicidad. De entre ellos destacamos, la combinación de TRAIL con inhibidores del proteasoma como Bortezomib, con inhibidores de histonas deacetilasas como Vorisnostat, con miméticos de Smac, con inhibidores de los receptores tirosín quinasa como gefitinib o con inhibidores de mTOR como Rapamicina, muchos de los cuales están siendo actualmente testados en estudios preclínicos.

3. La familia del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR/ErbB) en cáncer.

La familia **EGFR/ErbB** se encuentra implicada en el desarrollo normal de la glándula mamaria, en la regulación del mantenimiento y renovación del epitelio escamosos y los sistemas cardiovascular y nervioso. La mayoría de los factores de la familia de receptores ErbB y sus ligandos, se expresan en momentos determinados del desarrollo de la glándula mamaria, siendo las etapas de mayor contribución la pubertad, embarazo y lactancia, cuando las hormonas esteroideas inducen la producción de diversos factores de crecimiento entre los que se incluyen los de la familia de EGF. (Eccles 2011).

Sin embargo, una desregulación en las rutas de señalización de ErbB ha sido descrita en diversos tipos de cáncer, incluido el de mama. Además, aunque la sobreexpresión de EGFR podemos observarla en todos los subtipos de cáncer de mama, ésta es aún mayor en aquellos más agresivos como los tumores de mama triple negativos (TNBC) y en tumores de mama inflamatorios (IBC) encontrándose asociada a un incremento del tamaño del tumor, una pobre diferenciación y mal pronóstico. (Masuda & Zhang 2012).

Por ello, y debido a que uno de los principales objetivos en el campo de la investigación contra el cáncer, es la búsqueda de nuevas dianas moleculares que permitan predecir y determinar el pronóstico y la respuesta terapéutica del tumor, posibilitando un tratamiento tumoral selectivo y más eficiente, basado en la biología molecular del tumor, se definieron a los miembros de la familia del receptor del factor de crecimiento epidermal **EGFR/ErbB** como una de las dianas moleculares más importantes identificadas hasta la fecha.

3.1. Familia EGFR/ErbB y ligandos.

La familia EGFR/ErbB humana de receptores tirosina quinasa (RTK) se compone de cuatro receptores diferentes: el EGFR (también conocido como ErbB-1/HER1), ErbB-2 (neu/HER2), ErbB-3 (HER3) y ErbB-4 (HER4) (Yarden & Sliwkowski 2001; Ferguson et al. 2003) (**Figura 18**).

Todas las proteínas de esta familia son proteínas transmembrana de tipo I, con un dominio extracelular de unión al ligando, un dominio hidrofóbico transmembrana, y un dominio tirosina quinasa citoplasmático. El dominio tirosina quinasa intracelular está muy conservado en todos los miembros de la familia excepto en ErbB-3, que presenta sustituidos los aminoácidos críticos para la actividad quinasa. El dominio extracelular, sin embargo, está menos conservado entre los cuatro miembros lo que sugiere distinta especificidad en la unión al ligando (Normanno et al. 2006).

Los receptores de la familia ErbB se activan tras la unión al ligando, el cual pertenece a la familia de factores de crecimiento del EGF. Estos pueden ser secretados por la propia célula que expresa el receptor (secreción autocrina) o por células circundantes (secreción paracrina) (Olayioye et al. 2000; Yarden & Sliwkowski 2001). Las proteínas pertenecientes a esta familia se caracterizan por presentar un dominio EGF-like compuesto por tres grupos intramoleculares unidos por tres puentes disulfuro, lo que les confiere la especificidad de unión, y un dominio estructural adicional como tipo inmunoglobulina, de unión a heparina y sitios de glicosilación.

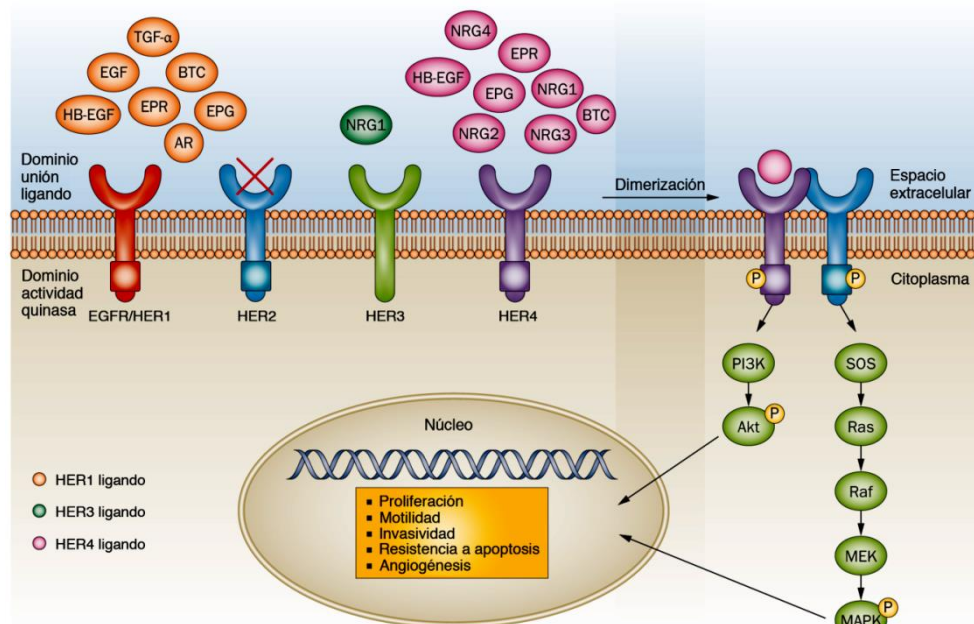


Figura 18: Familia EGFR/ErbB y ligandos. Adaptado de "Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives" (Arteaga et al. 2011).

Con respecto a la unión al receptor, los factores de crecimiento de la familia de EGF se pueden dividir en tres grupos (Yarden & Slivkowski 2001; Normanno et al. 2003) . El primer grupo incluye el EGF, el factor de crecimiento transformante- α (TGF- α) y la ampiregulina (AR) los cuales se unen específicamente al EGFR. El segundo está compuesto por la betacelulina (BTC), el factor de crecimiento de unión a heparina (HB-EGF) y la epiregulina (ERG), que se unen tanto a EGFR como a ErbB-4. Al tercer grupo pertenecen las neuroregulinas, las cuales se pueden subdividir en dos grupos, aquellas que se unen a ErbB-3 y ErbB-4 (NRG-1 y NRG-2) o las que solo se unen a ErbB-4 (NRG-3 y NRG-4). Ningún péptido de la familia de EGF se une a ErbB-2 (Normanno et al. 2006) (**Figura 18**).

3.2 Señalización mediada por ErbB.

La **activación de los receptores ErbB**, tiene lugar tras la unión del ligando al dominio extracelular lo que induce la formación de homo y heterodímeros y la consiguiente activación del dominio tirosina quinasa que a su vez permitirá la fosforilación de distintos residuos tirosina situados dentro del dominio citoplasmático, que actuarán como sitios de reclutamiento para proteínas que contengan dominios de homología a Src 2 (SH2) y de unión a fosfotirosina (PTB).

Se han descrito ya, todas las combinaciones posibles (homo y heterodiméricas) entre los distintos miembros de ErbB, determinándose como necesaria la heterodimerización de ErbB-2 y ErbB3 con otro miembro de la familia para la transducción de señales (Normanno et al. 2006).

Los receptores fosforilados activos van a reclutar diversas proteínas señalizadoras como Shc, Grb7, Grb2, Crk, Nck, la fosfolipasa C γ (PLC γ), las quinasas intracelulares Src y PI3K, las tirosina fosfatasas SHP1 y SHP2 y la E3 ubiquitín ligasa Cbl, que van a permitir iniciar la señalización (Marmor & Yarden 2004). De esta manera, todos los ligandos ErbB y receptores dan lugar a la activación de la ruta de Ras/Raf/MEK/MAPK a través de las proteínas adaptadoras Grb2 o Shc. Los receptores de ErbB también activarán la cascada de señalización PI3K/Akt a través del reclutamiento de la subunidad reguladora p85 (Jorissen et al. 2003). No obstante, la afinidad por los distintos sustratos varía entre los distintos receptores originando diferencias en intensidad y velocidad de la señalización. Finalmente, los receptores de ErbB también inducen la activación de varios factores de transcripción como son c-fos, c-Jun, c-myc, transductores de la señal y activadores de la transcripción (STAT), NF- κ B y miembros de la familia ETS (Normanno et al. 2006)

3.3 ErbB-2 (neu/HER2).

El receptor del factor de crecimiento epidermal humano -2 (HER2), es uno de los principales factores implicados en la supervivencia y proliferación de las células tumorales (Tai et al. 2010).

Aproximadamente, entre un 20 y un 30% de los tumores de mama primarios son considerados HER2 positivos debido a su sobreexpresión y/o a una amplificación del gen HER2 (Slamon et al. 1987; Slamon et al. 1989), lo que además se asocia con una mayor agresividad y peor pronóstico del tumor. Por esta razón, conocer la actividad y función de HER2 es fundamental para el desarrollo de nuevas terapias que impidan su acción en tumores de mama HER2 positivos

HER2 es una proteína de 185KDa también conocida como Neu o ErbB2. Tradicionalmente HER2 ha sido considerado como un receptor huérfano que muestra una conformación constitutivamente activa, que requiere de la heterodimerización con otro miembro de la familia EGFR para activar su señalización. Sin embargo, una elevada concentración del receptor en la membrana de las células que sobreexpresan HER2 permite la homodimerización independiente de ligando, la activación de su dominio quinasa y la inducción de las rutas de señalización dependientes de HER2: PI3K/AKT y RAS/RAF/MAPK promoviendo la proliferación celular, el crecimiento y la supervivencia así como la invasión y la angiogénesis (Dittrich et al. 2014).

- **ErbB2/HER2/Neu en la transformación oncogénica.**

La desregulación de la señalización mediada por ErbB ha sido descrita en distintos tipos de cáncer. En estudios in vitro en células de ratón NIH-3T3, se observó como la sobreexpresión tanto de EGFR como de ErbB-2 inducía transformación tumoral. En el caso de EGFR era dependiente de EGF exógeno, mientras que la transformación inducida por ErbB-2 estaba directamente relacionada con sus niveles de expresión (Di Fiore, Pierce, Fleming, et al. 1987; Di Fiore, Pierce, Kraus, et al. 1987).

Posteriormente se evaluó el potencial de los receptores de ErbB para inducir transformación in vivo en diferentes modelos de ratones transgénicos, en los que se observó que ErbB-2 era el miembro de la familia EGFR con mayor potencial para inducir transformación tumoral. De este modo, distintos estudios mostraron que la sobreexpresión de una forma activa del análogo de ErbB2 de ratón Neu, el cual contiene una mutación en su dominio transmembrana (NeuT), bajo el control del promotor MMTV (del inglés, Mouse mamary tumor virus), inducía el desarrollo de adenocarcinomas mamarios (Pattengale et al. 1989; Muller et al. 1988). Tanto la sobreexpresión de la forma normal (NeuN) como de la mutante de ErbB2 (NeuT) inducen la formación de tumores, no obstante, la forma mutante inducía una progresión tumoral mucho más rápida y agresiva (Guy et al. 1996).

- **Terapia anti-Her2.**

Los receptores EGFR y ErbB-2 han sido considerados como diana para el desarrollo de aproximaciones inmunoterapéuticas en el tratamiento del cáncer de mama, fundamentalmente a

través de terapias basadas en el uso de anticuerpos como el anticuerpo monoclonal Trastuzumab contra ErbB2.

Asimismo, en la actualidad, inhibidores de la actividad ERBB2 están siendo utilizados en el tratamiento de cáncer de mama. Es el caso del Lapatinib, una pequeña molécula que actúa como inhibidor de la actividad tirosina quinasa están teniendo resultados muy positivos en el tratamiento del cáncer de mama. Ambos se encuentran en ensayos clínicos de fase III.

Además se están desarrollando nuevos agentes, entre ellos vacunas, anticuerpos modificados, inhibidores de la actividad tirosina quinasa y otros compuestos directos contra HER2 y otros miembros de la familia, y contra las rutas que se encuentran aguas abajo en la señalización, así como contra aquellas que median la resistencia. Entre las dianas se encuentran mTOR, PI3K, IGFR-1, Akt, HSP90 y VEGF (Arteaga et al. 2011).

4. La Transición epitelio-mesénquima (EMT).

La transición epitelio mesénquima o EMT (*del inglés, epithelial to mesenchymal transition*) es un proceso de transdiferenciación celular transitorio y reversible que juega un papel fundamental durante el desarrollo embrionario, en el cual las células pueden transitar entre un estado epitelial y mesenquimal de modo altamente dinámico y plástico (Nieto et al. 2016).

El término EMT, describe una serie de eventos bioquímicos que provocan que una célula epitelial de morfología poligonal, no móvil, con polarización apico-basal y conectada firmemente con otra célula mediante uniones adherentes y estrechas, pierda progresivamente sus características epiteliales y adquiera propiedades típicas de células mesenquimales entre las que se incluyen: una morfología alargada, mayor capacidad de migración e invasividad, resistencia a apoptosis y un incremento en la producción de componentes de la matriz extracelular (ECM) (Kalluri & Neilson 2003; Kalluri & Weinberg 2009).

El final del proceso de EMT se produce con la degradación de la membrana basal inferior y la formación de una célula mesenquimal que puede migrar lejos de la capa epitelial en la que se ha originado. Todo esto, requiere un conjunto de cambios complejos en la arquitectura y comportamiento celular que serán promovidos por distintos procesos moleculares, que implican la activación de factores de transcripción, expresión de proteínas específicas de la superficie celular, reorganización y expresión de proteínas del citoesqueleto, producción de enzimas encargadas de degradar la EMC y cambios en la expresión de microRNAs (**Figura 19**), que constituyen además los biomarcadores empleados para demostrar el paso de una célula a través de un proceso de EMT

(Thiery & Sleeman 2006; Kalluri & Weinberg 2009). De este modo, el estado epitelial se caracteriza por la expresión de marcadores como la E-caderina y la Ocludina (proteínas de las uniones celulares), mientras que el estado mesenquimal queda definido por la pérdida de estos marcadores y la adquisición de otros marcadores de expresión como la N-caderina y la Fibronectina (Nieto 2009).

Además, la EMT implica una plasticidad fenotípica que se refleja en la capacidad de estas células de ejecutar el proceso contrario, una **transición mesénquima-epitelio (MET)**, la cual implica la conversión de células mesenquimales en epiteliales (Thiery & Sleeman 2006).

La clásica definición de EMT como la transformación de células epiteliales en células mesenquimales (Hay 1995) nos condiciona a percibir este proceso, como un cambio entre dos únicos estados extremos alternativos y supone una malinterpretación de la acción normal de este programa que normalmente oscila entre un estado completamente epitelial y un estado parcialmente mesenquimal que mantiene ciertos marcadores epiteliales (Grünert et al. 2003).

De hecho, el término “transformación” fue sustituido por “transición” al descubrirse la existencia de todo un espectro de fenotipos intermedios denominados **estados metaestables** asociados a un programa de EMT parcial, que puede caracterizarse por la co-expresión de marcadores epiteliales y mesenquimales que no implica necesariamente un cambio morfológico evidente (Tam & Weinberg 2013) y recientemente se ha descrito que las células no necesitan adquirir marcadores mesenquimales en una EMT parcial, sino que ésta podría simplemente implicar una disminución de propiedades epiteliales como la polaridad apico-basal y la remodelación de los complejos de las uniones en favor de adhesiones célula-sustrato (Huang et al. 2012).

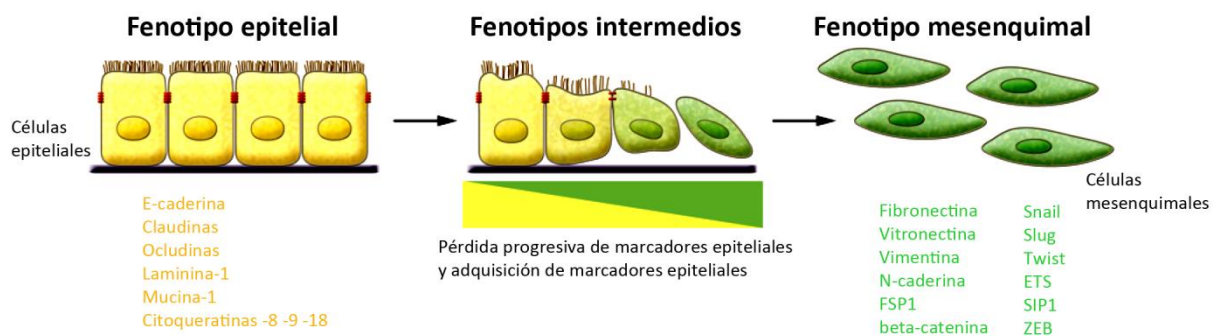


Figura 19: Proceso de transición epitelio-mesénquima. Adaptado de “The basics of epithelial-mesenchymal transition”(Kalluri & Weinberg 2009).

En conjunto, todo esto nos muestra el delicado equilibrio existente entre los inductores y los represores del proceso de EMT y nos ofrece una interpretación más dinámica de la fluidez y plasticidad de este proceso (Nieto et al. 2016).

Como mencioné anteriormente, la EMT presenta un papel fisiológico fundamental durante el desarrollo embrionario permitiendo la generación de tejidos y órganos cuyos precursores son originados lejos de su destino final. En contraposición, en células adultas, el proceso de EMT tiene lugar en condiciones patológicas encontrándose implicada en el desarrollo de la progresión tumoral y de enfermedades degenerativas como la fibrosis (Nieto 2009).

4.1. Tipos de EMT.

La transición epitelio-mesénquima o EMT puede clasificarse en 3 subtipos distintos en función del contexto celular en el que se produzca y de las consecuencias funcionales que provoque. De este modo, la EMT tipo I se asocia al desarrollo embrionario, la EMT tipo II asociada a la regeneración tisular y a la fibrosis y la EMT tipo III relacionada con la progresión tumoral y la metástasis (Kalluri & Weinberg 2009).

I. EMT tipo I: EMT durante la embriogénesis y el desarrollo de órganos

Este tipo de EMT tiene lugar durante la implantación del embrión en el útero, durante la gastrulación y durante la formación de la cresta neural en amniotas. No provoca fibrosis ni induce un fenotipo invasivo, sino que genera células mesenquimales con potencial para experimentar el proceso reverso de MET y generar un epitelio secundario (Kalluri & Weinberg 2009)

Durante la **implantación embrionaria**, determinadas células del área extraembrionaria, experimentan un proceso de EMT, lo que permite por ejemplo que las células del tropoectodermo se infiltren en el endometrio y se anclen a la placenta (Pijnenborg et al. 1980).

La **gastrulación**, es el proceso fundamental que permite la formación de las tres capas embrionarias germinales: Ectodermo, mesodermo y endodermo, a partir de epiblasto que es la primera capa embrionaria epitelial. Este proceso, requiere un conjunto de cambios drásticos necesarios para remodelar una única capa epitelial y transformarla en un embrión multilaminado y tridimensional. De este modo, tal y como se muestra en el **Figura 20**, un conjunto de células del epiblasto, se desplaza hasta la línea central formando la línea primitiva. En este momento, la membrana basal se rompe localmente y estas células inician un proceso de EMT y se internalizan generando el mesodermo y el endodermo, mientras que aquellas que permanecen en el epiblasto conformarán el ectodermo. Así, a través de varios ciclos de EMT y MET, el ectodermo dará lugar a la piel y al sistema

nervioso, el mesodermo originará el músculo cardíaco y el esqueleto y el endodermo formará el tracto digestivo (Acloque et al. 2009). Desde un punto de vista bioquímico, en el programa de EMT que se inicia durante la gastrulación participan como moléculas señalizadoras, proteínas de la familia de TGF β (Nodal, Bg1 y BMPs) junto con Wnts y FGF (Skromne & Stern 2001; Chea et al. 2005; Mathieu et al. 2004) que activarán genes de la familia de Snail que reprimirán la expresión de la E-caderina e inducirá la transición epitelio-mesénquima (Nieto 2002).

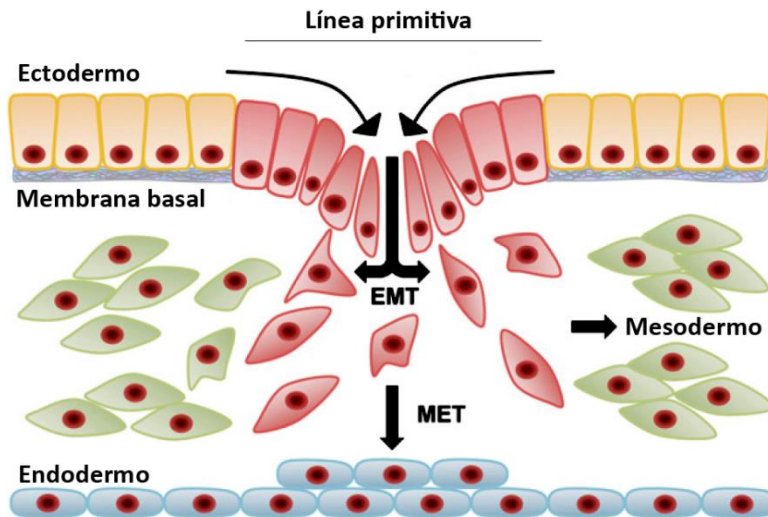


Figura 20: EMT de tipo I: gastrulación.
Adaptado de " Role of Cripto-1 during epithelial to mesenchymal transition in development and cancer" (Rangel et al. 2012).

Asimismo, el proceso de EMT también se produce durante el desarrollo del sistema nervioso de vertebrados originando las células de la **cresta neural**. Las células epiteliales localizadas cerca del tubo neural experimentan un proceso de EMT que dota de capacidad migratoria a las células de la cresta neural, las cuales se desplazarán lejos del tubo neural, recorrerán todo el embrión y se diferenciarán en tejido óseo, músculo liso, neuronas periféricas y melanocitos, para lo cual y del mismo modo que durante la gastrulación serán necesarios distintos ciclos de EMT y MET (Duband et al. 1995).

II. EMT tipo II: EMT asociada a la regeneración tisular y la fibrosis.

Se trata de un tipo de EMT que tiene lugar en el tejido adulto y se asocia con cicatrización, regeneración de tejidos y fibrosis. Se produce en respuesta a una señal inflamatoria o de daño tisular que requiere el inicio de un programa de reparación que normalmente genera fibroblastos y otros tipos celulares similares, con la finalidad de reconstruir el tejido u órgano en cuestión (Kalluri & Neilson 2003).

Los primeros logros en este campo proceden de estudios en ratones transgénicos, portadores de genes reporteros controlados por promotores epiteliales, cuyo comportamiento evidenció que las

células epiteliales, vía EMT, eran precursoras de los fibroblastos que se originaban durante la fibrosis (Rastaldi et al. 2002).

Durante el proceso de **cicatrización**, las células localizadas alrededor de la herida son capaces de restaurar la arquitectura original del tejido gracias a la transición epitelio-mesénquima (Martin 1997). De este modo, tras un daño en la piel, los queratinocitos epidérmicos que se encuentran a lo largo de los límites de la herida, sufren un proceso similar a la EMT denominado EMT parcial que les permite migrar al lugar del daño. Así, estos queratinocitos, pierden sus contactos célula-célula y célula-sustrato, secretan enzimas que degradan la matriz, reorganizan el citoesqueleto, migran hasta la herida e invaden el tejido conectivo subyacente, participando en la re-epitelización del tejido (Arnoux et al. 2008; Thiery & Sleeman 2006).

La fibrosis tiene lugar en tejidos epiteliales y está mediada por células inflamatorias y fibroblastos que emiten señales pro-inflamatorias y componentes de la matriz extracelular como colágeno y laminina. La fibrosis hace referencia a los tejidos conectivos que se forman con el objetivo de reparar una zona dañada, no obstante, si esta formación de tejido se vuelve excesiva e incontrolable, la fibrosis deriva en patológica y las funciones del órgano se ven comprometidas (Kalluri & Weinberg 2009). En este contexto, existen evidencias que implican a la EMT en los procesos de fibrosis que tiene lugar en riñón, hígado, pulmón e intestino (M. Zeisberg et al. 2007; E. M. Zeisberg et al. 2007; Kim et al. 2006).

III. EMT tipo III: EMT durante la progresión tumoral y la metástasis.

Del mismo modo que la adquisición de propiedades invasivas y migratorias resulta fundamental durante los procesos de desarrollo embrionario, numerosas evidencias muestran que estas características son igualmente importantes durante una etapa determinada de la progresión tumoral: la formación de metástasis. Por ello, se ha sugerido que la EMT se activa en ciertas células del tumor primario, las cuales adquieren un estado mesenquimal que las dota de las características necesarias para migrar fuera del tumor primario y colonizar sitios distantes en los que se establecen originando las metástasis (Thiery et al. 2009). De este modo y aunque datos recientes sugieren cautela en cuanto al papel de la EMT durante la progresión tumoral (Fischer et al. 2015; Zheng et al. 2015), lo cierto es que numerosas evidencias apoyan la idea de que la EMT (vista como un espectro de estados intermedios) podría activarse por señales procedentes del microambiente tumoral y desencadenar una serie de acontecimientos clave necesarios para la progresión tumoral (Ye & Weinberg 2015; Lamouille et al. 2014; Thiery et al. 2009).

4.2. EMT y cáncer.

Aproximadamente el 80% de los tumores malignos humanos derivan de tejidos epiteliales originando los tipos de cáncer más comunes (pulmón, colón, mama, páncreas, próstata...) y el estado epitelial de las células de origen, determina que en una etapa temprana los tumores que surgen de estos tejidos continúan expresando citoqueratinas y E-caderina, marcadores del estado epitelial. Además, las células neoplásicas de estos tumores primarios también conservan características propias de un fenotipo epitelial como la ausencia de motilidad y la capacidad para formar láminas celulares continuas. En contraposición, las células procedentes de tumores más avanzados que han sido sometidas a toda una sucesión de acontecimientos que denominamos como “progresión tumoral”, presentan características de células mesenquimales, asociadas con la diseminación metastásica (Huber et al. 2005; Rhim et al. 2012; Sarrió et al. 2008) y que podrían explicarse por una activación durante la progresión tumoral de un programa de EMT.

En el caso por ejemplo del cáncer de mama, la adquisición de características mesenquimales se encuentra directamente relacionada con los subtipos más agresivos de esta enfermedad. En este sentido, se han realizado numerosos estudios de pérdida y ganancia de función en modelos de xenoinjertos tumorales, que demuestran la existencia de un enlace entre la activación de EMT y la adquisición de propiedades malignas. De este modo la eliminación de los EMT-TFs Twist, Snail y Zeb1 inhiben la diseminación metastásica, así como la expresión de éstos induce la activación de un programa de EMT que potencia la diseminación metastásica de células tumorales de mama en ratón (Roy et al. 2014; Wu et al. 2009; Yang et al. 2004; Tran et al. 2014).

Por otro lado, la transición epitelio-mesénquima también parece tener un papel en la resistencia a fármacos y consecuente recurrencia de la enfermedad en pacientes con cáncer de mama (Cheng et al. 2014; Creighton et al. 2009; Oliveras-Ferraro et al. 2012). En un modelo de ratón de inducción de tumores por Her2, el EMT-TF Snail se activa espontáneamente en tumores recurrentes in vivo dotándolos de un fenotipo mesenquimal (Moody et al. 2005). Además, la conexión entre activación de la EMT y una mayor tumorigenicidad ha sido confirmada en una gran variedad de líneas tumorales humanas (Creighton et al. 2010) y recientemente, se ha descrito como la inhibición de la activación del EMT-TF Zeb1 suprime la transición de células tumorales de un estado ligeramente tumorigénico a un estado muy agresivo, en el que se incrementa la capacidad iniciadora de tumores (Chaffer et al. 2013).

4.2.1. EMT en la regulación de la cascada metastásica.

En células tumorales, la adquisición de características mesenquimales es el resultado de la activación de un programa de EMT que proporciona a estas células las características necesarias para ejecutar la mayor parte de los pasos que componen la cascada de invasión y metástasis (Polyak & Weinberg 2009).

Esta cascada implica que en respuesta a una señal inductora de EMT, una población de células epiteliales del tumor primario pierdan sus propiedades epiteliales y comience a separarse del conjunto de células del tumor original adquiriendo, gracias a las señales de EMT proporcionadas por las células del estroma, ciertas características de célula mesenquimal (estado metaestable intermedio) que permiten la invasión de los tejidos colindantes. Un fenotipo completamente mesenquimal facilita la intravasación en capilares sanguíneos o vesículas linfáticas y la mayor resistencia al estrés genotóxico permite que las células viajen a través del torrente sanguíneo, extravasen e invadan un nuevo tejido. Aquí, las células deben adaptarse y sobrevivir en el parénquima de un órgano distante y formar los depósitos micrometastásicos, algunos de los cuales pueden ocasionalmente formar metástasis macroscópicas. Este último paso, se denomina colonización e implica la adaptación de las células tumorales a un tejido y un microambiente diferente (**Figura 21**), proceso en el cual la EMT no parece tener ningún papel (Tam & Weinberg 2013). Es importante destacar, que la ganancia por parte de las células tumorales de características mesenquimales no es permanente, sino que posteriormente, tanto las células que habían experimentado un proceso de EMT en el tumor primario, como aquellas que han colonizado el nuevo tejido, vuelven a adquirir un estado epitelial a través de una transición mesénquima-epitelio (MET), necesaria para la colonización y que pone de manifiesto la naturaleza plástica de todos estos cambios (Ocaña et al. 2012; Tsai et al. 2012).

Los patrones de activación de la EMT durante el desarrollo dictan que este programa se inicia en respuesta a señales del microambiente celular, por ello y en extensión, un patrón de señales similar debe operar durante la progresión tumoral, dando lugar a la activación de este programa. De hecho, en ciertos tumores la activación del proceso de EMT puede observarse en células localizadas muy próximas a las células del estroma, en concreto de las células que forman el estroma activo, que se desarrolla posteriormente durante la progresión tumoral y se compone no solo de fibroblastos y myofibroblastos sino que también están presentes otros tipos celulares relacionados con cicatrización e inflamación tales como células madre mesenquimales (MSCs) macrófagos y linfocitos (Ye & Weinberg 2015)

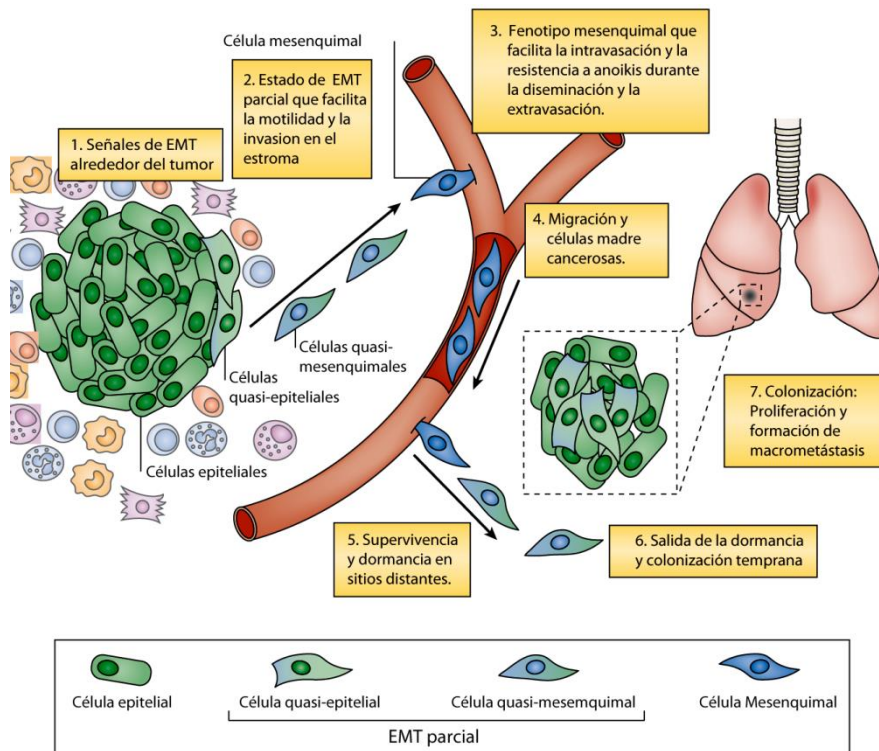


Figura 21: La plasticidad del proceso de EMT permite que las células tumorales adquieran adaptaciones funcionales durante el proceso de invasión y metástasis. Adaptado de “The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer” (Tam & Weinberg 2013).

Una vez activado, el mantenimiento del programa de EMT de una célula del tumor dependerá de las continuas señales paracrinias recibidas del estroma (lo que explica el proceso de MET que permite a las células adquirir de nuevo un estado epitelial cuando no detectan las señales inductoras). Una de las señales paracrinias mejor descritas es la del factor de crecimiento transformante TGF β , el cual es fundamentalmente liberado por los myofibroblastos (Oft et al. 1998). Además se han descrito muchas otras moléculas señalizadoras alternativas que participan en el proceso de inducción de la EMT tales como Wnt, Notch, Sonic hedgehog (Shh), citoquinas, prostaglandina E2 (PGE2) y factores de crecimiento (EGF, FGF, HGF, PDGF y VEGF) (Thiery et al. 2009) e incluso alternativamente, el programa de EMT de la célula tumoral podría mantenerse de manera autónoma mediante puntos de retroalimentación positiva (Scheel et al. 2011). Es importante reseñar que en cualquier circunstancia, el programa de EMT se activará en respuesta a distintas señales que actuarán de manera conjunta asegurando que la EMT solo se activa cuando se cumplen todos los requisitos necesarios (Thiery et al. 2009).

En estudios realizados con tumores de mama en modelos de ratón, utilizado para seguir la activación endógena de EMT-TF Snail (Tran et al. 2014; Ye et al. 2015), se ha demostrado que la activación endógena de Snail y del programa de EMT se produce en el tumor primario y permitiendo la invasión y la formación de células tumorales circulantes (CTCs), pero que no es requerida para la colonización metastásica. De hecho, las metástasis distantes encontradas en pacientes suelen mostrar

características epiteliales, una organización que se corresponde con la de su tejido de origen y varios trabajos convergen en la idea de que la activación constitutiva de un programa de EMT, bloquearía la MET, previniendo la colonización metastásica (Ocaña et al. 2012; Tsai et al. 2012).

4.2.2. EMT y células madre cancerígenas.

La heterogeneidad celular ha sido ampliamente descrita en diferentes tipos de tumores sólidos y hematopoyéticos, lo que implica la coexistencia de células tumorales con distintos potenciales tumorigénicos, que puede ser explicada bien por la sucesiva acumulación de mutaciones que originarían los diferentes subclones o por la hipótesis de la existencia de una población de células con mayor potencial tumorigénico denominadas **células tumorales iniciadoras o células madre tumorales** (CSCs, del inglés *Cancer Stem Cells*) (Ye & Weinberg 2015).

Las CSCs presentan las mismas características que las células madre normales en tanto a su capacidad de auto-renovación y generación de progenitores que pueden diferenciarse originando distintos tipos celulares (división asimétrica). Las CSCs representan por tanto, un pequeño porcentaje del tumor y son responsables de la progresión, mantenimiento y crecimiento del tumor manteniendo por un lado la población de CSCs y por otro generando una población no tumorigénica diferenciada. Las poblaciones de células madre tumorales pueden ser definidas y aisladas en base a la expresión de una serie de marcadores de membrana específicos de cada órgano. En el caso de los tumores de mama, las CSCs pueden ser aisladas de otras células de tumor pues se caracterizan por una baja expresión del marcador de superficie CD24 y un incremento de CD44 (Al-Hajj et al. 2003; Al-Hajj & Clarke 2004). Además, del mismo modo que las células madre normales, las células tumorales CD24⁻/CD44⁺, forman mamóferas en condiciones no adherentes y su implantación en ratones inmunodeprimidos permite la generación de tumores.

Recientes estudios han establecido un link entre la inducción de la EMT y la adquisición de características funcionales y moleculares de CSCs. En este sentido, la sobreexpresión de los EMT-TFs TWIST, SNAIL y ZEB1 en células epiteliales de mama inmortalizadas o transformadas, incrementa la frecuencia de CSCs iniciadoras de tumores (Morel et al. 2008; Morel et al. 2012; Guo et al. 2012). Además, tumores de mama de ratón y humanos, con una elevada expresión de EMT-TFs se encuentran enriquecidos en CSCs (Taube et al. 2010).

La actividad transcripcional de los EMT-TFs está implicada en la adquisición de propiedades propias de célula madre a distintos niveles (**Figura 22**). El factor de transcripción TWIST puede activar la expresión de BMI1, proteína que mantiene la capacidad de auto-renovación mediante la represión del locus INK4A/ARF (Yang et al. 2010).

ZEB1 puede reprimir los miembros de la familia miR200 que controlan la expresión de genes asociados con células madre BMI1, KLF4 y SOX2 (Wellner et al. 2009; Shimono et al. 2009). SNAI2 o SLUG coopera con el factor de transcripción SOX9, factor importante para el mantenimiento del estado de célula madre en adultos ya que induce la dediferenciación de células epiteliales de mama y confiere la propiedad de formar mamóferas (Guo et al. 2012).

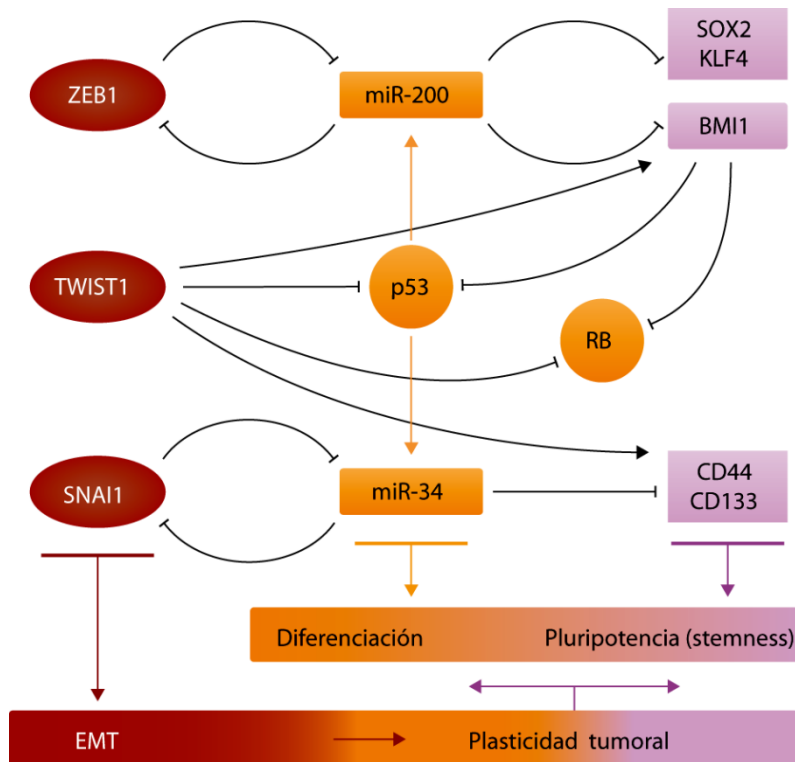


Figura 22: Relación cruzada entre EMT-TFs y factores asociados a "stemness" Adaptado de "Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors" (Puisieux et al. 2014).

4.2.3. EMT y resistencia a tratamientos tumorales.

La transición epitelio-mesénquima confiere resistencia a la muerte celular inducida por diferentes estímulos (incluidos los quimioterapéuticos), tanto en embriones como en células tumorales (Thiery et al. 2009; Vega et al. 2004; Singh & Settleman 2010). De acuerdo con esto, líneas celulares epiteliales de colon que adquieren resistencia a oxiplatino muestran una morfología mesenquimal y expresan marcadores de EMT (Yang et al. 2006). Del mismo modo, la resistencia de líneas celulares tumorales epiteliales de ovario a paclitaxel también se encuentra asociada con la pérdida del fenotipo epitelial (Kajiyama et al. 2007). Del mismo modo una población de células MCF7 o MDA-MB434 seleccionadas por sus propiedades invasivas, presentaban unos niveles elevados de Twist y resistencia a paclitaxel (Cheng et al. 2007). Snail también confiere resistencia a paclitaxel, adriamicina y radiación antagonizando la apoptosis mediada por p53 (Kajita et al. 2004; Kurrey et al. 2009).

4.3. Vías de señalización de la EMT.

La transición epitelio-mesénquima es un proceso finamente regulado que presenta un papel tanto durante el desarrollo embrionario como durante la regeneración tisular o la progresión tumoral. Además, las vías de señalización implicadas en los diferentes tipos de EMT son muy similares.

Los estudios con cultivos celulares han sido fundamentales para establecer los mecanismos moleculares que regulan este proceso y han mostrado la existencia de un elevado número de procesos moleculares que cooperan en la iniciación y finalización de la EMT. Además, han permitido mostrar la presencia de numerosos puntos de “crosstalk” que permiten la activación y represión de este proceso así como el hecho de que las distintas rutas de señalización de EMT converjan en los mismos eventos finales tales como la disminución de los niveles de expresión de E-caderina y la expresión de genes asociados a EMT (Thiery & Sleeman 2006; Lamouille et al. 2014).

El mecanismo encargado de la regulación de la EMT no es lineal sino que se produce a diferentes niveles e integra modificaciones epigenéticas, controles transcripcionales, splicing alternativo, estabilidad de proteínas y localización subcelular (Nieto et al. 2016). Independientemente del contexto, los eventos clave durante el proceso de transición epitelio-mesénquima (**Figura 23**) son la reducción de las adhesiones epiteliales célula-célula mediante la represión transcripcional de las caderinas (componentes fundamentales de las uniones célula célula), ocludina y claudina (componentes de las uniones estrechas) y desmoplaquinas (componentes de los desmosomas) , la pérdida de la polaridad apico-basal y la adquisición de una polaridad frontal posterior (necesaria para migración direccional), la reorganización del citoesqueleto y cambios en la morfología celular, la disminución de toda una firma de expresión génica epitelial y la activación de genes que favorecen la definición del fenotipo mesenquimal, promoviendo el incremento de las protusiones celulares y la movilidad y la habilidad para degradar proteínas de la matriz extracelular (ECM) que permitan la adquisición de un comportamiento invasivo (Thiery & Sleeman 2006).

Todas estas vías son activadas en respuesta a señales activadoras de diverso origen, enviadas por el microambiente y las estructuras adyacentes, asegurándose así una cierta especificidad. Entre estas señales destacan las procedentes de componentes de la matriz extracelular como colágeno o ácido hialurónico (Thiery & Sleeman 2006) y las de factores de crecimiento como miembros de la familia de TGF β , FGF, EGF y DF/HGF (Gonzalez & Medici 2014). La señalización mediada por receptor en respuesta a estos ligandos, induce la activación de moléculas efectoras intracelulares tales como los miembros de la familia de las GTPasas: Ras, Rho y Rac y miembros de la familia de la tirosina-quinasa Src.

Estos efectores, promueven la ruptura de las uniones célula-célula y los cambios en la organización del citoesqueleto que se producen durante la EMT.

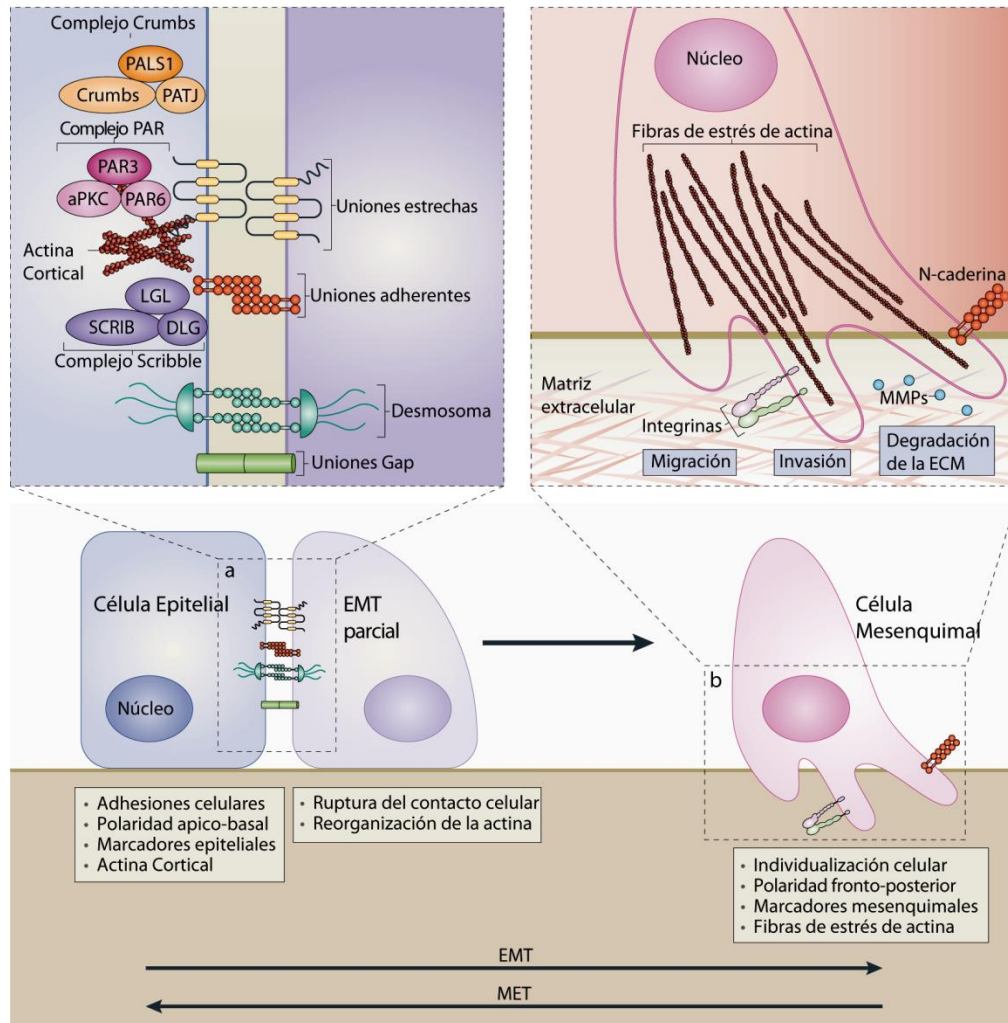


Figura 23: Eventos celulares durante la EMT. Adaptado de “Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition” (Lamouille et al. 2014)

Además la activación de estas rutas de señalización también produce la inducción de factores de transcripción (EMT-TFs) que promueven cambios en los patrones de expresión génica que subyacen la EMT.

Cabe destacar que diferentes activadores extracelulares activan las mismas vías de activación intracelulares y que por lo general, la activación de un proceso de EMT necesita de la combinación de diferentes señales. La primera tiene la función de iniciar el proceso mientras que las otras garantizan su mantenimiento (Thiery & Sleeman 2006; Gonzalez & Medici 2014).

Los factores de transcripción inductores de EMT son denominados **EMT-TFs** y pertenecen a 3 familias principales: **SNAIL** (SNAIL1 o SNAIL, SNAIL2 o SLUG y SNAIL3 o SMUC), **ZEB** (ZEB1, ZEB2) y **TWIST** (TWIST1, TWIST2). La expresión de estos factores de transcripción se produce durante una etapa temprana del proceso de EMT y presentan papeles centrales en desarrollo, fibrosis y cáncer (Lamouille et al. 2014; Barrallo-Gimeno & Nieto 2005). Debido a sus diferentes perfiles de expresión, su contribución a la EMT dependerá del tipo celular o tejido implicado y de la ruta de señalización que inicie el programa. Además pueden controlar la expresión entre ellos y colaboran para activar los mismos genes diana (Peinado et al. 2007). Es importante mencionar que también se han descrito otros factores con estas propiedades tales como Goosecoid, FOXC2, SIX1 y más recientemente PRRX1 (Craene & Berx 2013).

5. La familia de proteínas de TGF β .

La familia de citoquinas de TGF β se encuentra compuesta de 33 miembros en humanos, entre los que se incluyen las isoformas de TGF β , activinas, proteínas morfogénicas óseas (*BMPs, del inglés Bone Morphogenetic Proteins*) y factores de crecimiento y diferenciación (*GDFs, del inglés growth and differentiation factors*) (Heldin et al. 2009).

En mamíferos existen 3 isoformas de TGF β (β 1, β 2, β 3) que ejercen su función a múltiples niveles, participando tanto en la inducción de programas de desarrollo durante la embriogénesis como en el organismo adulto controlando el comportamiento celular, el sistema inmune y estimulando la angiogénesis. De este modo, se ha descrito que la familia de proteínas de TGF β interviene en aspectos esenciales relacionados con la fisiología y la homeostasis tisular regulando procesos como: proliferación celular, diferenciación, morfogénesis, migración, adhesión, transición epitelio-mesénquima, muerte y supervivencia celular. De hecho, la sobreactivación de miembros de la familia de TGF β se ha relacionado con diferentes enfermedades desde la fibrosis hasta el cáncer (Massague 1990; Wharton & Derynck 2009). Por esta razón, las rutas de señalización de TGF β suponen una interesante diana terapéutica para el desarrollo de fármacos (Akhurst & Hata 2012).

5.1. TGF β : Vías de señalización.

El factor β de crecimiento transformante (*TGF β , del inglés Transforming growth factor- β*) es una proteína de 25 KDa que ejerce una gran variedad de funciones diferentes incluso opuestas, dependiendo de las condiciones y del tipo celular (Miettinen et al. 1994; Massagué 2012).

Las 3 isoformas de TGF β son sintetizadas como proteínas precursoras inactivas a partir de las cuales se originan las formas maduras activas del factor. La molécula de citoquina biológicamente activa

consiste en un dímero compuesto por una cadena de polipéptidos que son procesados en el precursor por enzimas como la furina. El dímero activo de TGF β se une a un complejo heterotetramérico de la superficie celular compuesto por dos receptores con actividad quinasa tipo I y dos de tipo II. TGF β se une con mayor afinidad a sus receptores tipo II los cuales se fosforilan y acoplan a los receptores tipo I, que se unen al complejo y se activan propagando la señal hasta el núcleo, donde inducen o reprimen la transcripción de genes diana que regulan las distintas respuestas celulares (**Figura 24**). La respuesta de señalización intracelular de TGF β incluye tanto vías canónicas, a través de las proteínas SMAD como no canónicas (Derynck & Zhang 2003).

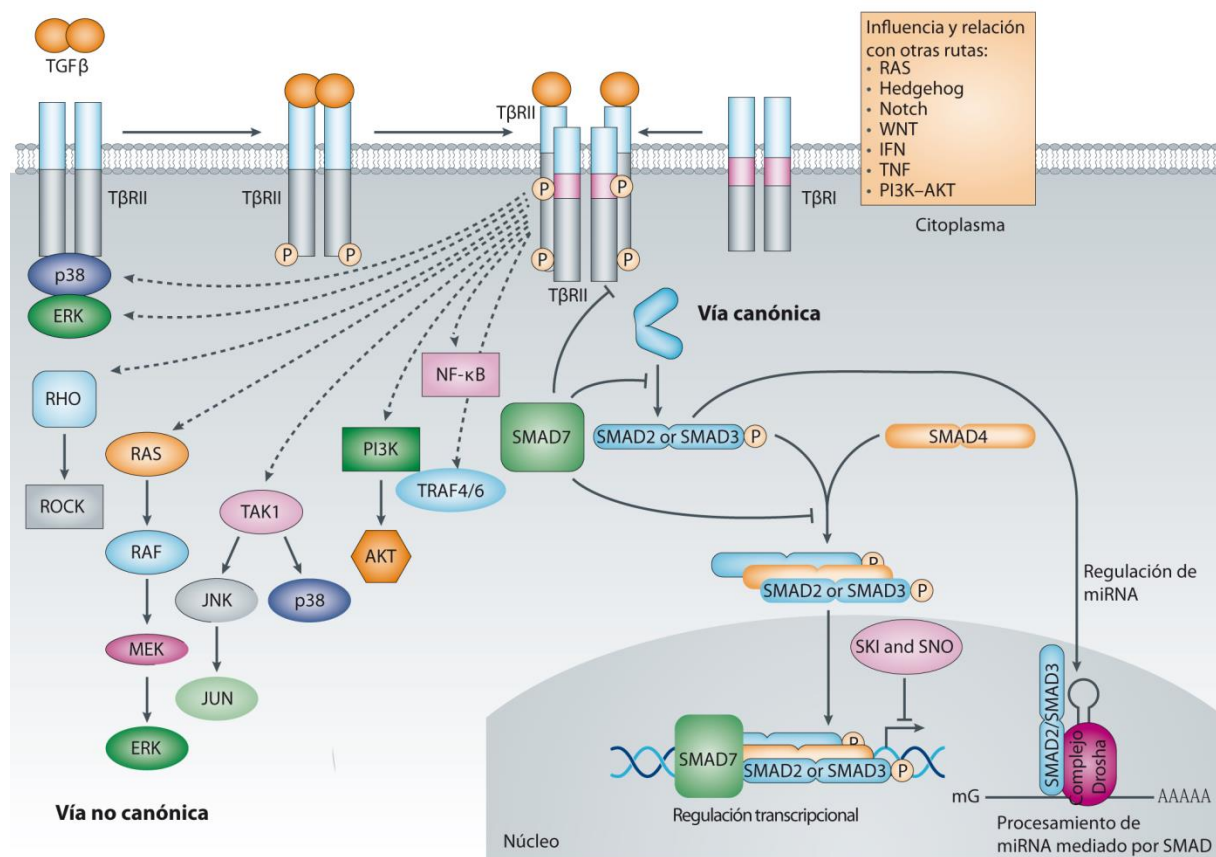


Figura 24: Señalización de TGF β a través de la ruta dependiente e independiente de proteínas SMAD. Adaptado de "Targeting the TGF β signaling pathway in disease" (Akhurst & Hata 2012)

- Vía de señalización canónica: señalización dependiente de las proteínas SMAD.

Las proteínas SMAD han sido identificadas como las principales transductoras de la señalización de TGF β . En vertebrados, se han descrito ocho proteínas SMAD que se clasifican en 3 categorías según su función (Derynck & Zhang 2003).

1. SMAD activadas por receptor o R-SMAD: SMAD-1, -2, -3, -5, -8. SMAD 2 y 3 son fosforiladas por receptores de TGF β y activinas mientras que SMAD 1, 5 y 8 por los receptores de BMP.
2. SMAD mediadora común o C-SMAD: SMAD -4
3. SMAD inhibidoras o I-SMAD: SMAD -6 y -7

En esta ruta, la activación del receptor tipo I (T β RI o ALK5) permite la fosforilación de dos residuos de serina en el motivo SXS c-terminal de las proteínas R-SMAD -2 y -3, las cuales se liberarán del complejo del receptor, se unirán al mediador común SMAD-4 y se translocarán al núcleo donde interaccionarán específicamente con otros factores de transcripción (cofactores) como AP-1 o participarán en la regulación y maduración de micro-RNAs (miRNAs) regulando respuestas transcripcionales relacionadas con las diferentes funciones biológicas de TGF β (de Caestecker 2004). La activación de las R-SMADs por ALK5 es inhibida por las I-SMADs que también son sintetizadas en respuesta a TGF β e interactúan con el receptor de tipo I/ALK5 compitiendo por él, o por el reclutamiento de E3 ligasas y fosfatasas a los complejos receptores que promueven la degradación mediada por ubiquitina o la defosforilación e inactivación de los mismos, sugiriendo mecanismos de auto-regulación negativa.

Por último, se han descrito mecanismos que van a determinar el final de la señalización de las SMADS. Este es el caso de los genes diana de SMADS: *SnoN* y *Ski*, los cuales codifican proteínas que se unen a las SMADS reprimiendo la transcripción en un mecanismo de retroalimentación negativa (**Figura x6**) (Heldin et al. 2009).

- **Vía de señalización no canónica: señalización independiente de las proteínas SMAD.**

La señalización de TGF β a través de otras vías no SMAD es uno de los mecanismos que subyacen a la multifuncionalidad y complejidad de respuestas del ligando, capaz de regular la actividad de una gran variedad de moléculas señalizadoras (**Figura 24**).

Esta ruta consiste en la transmisión de la señal procedente del complejo del receptor de TGF β a través de otros factores entre los que se incluyen: Factor 4 asociado al receptor de TNF (*TRAF4*, del inglés *Tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 4*), TRAF6, TAK1 o quinasa 1 activada por TGF β , MAP quinasas p38 y ERK, RHO GTPasa, PI3K-AKT, JNK o NF κ B (Akhurst & Hata 2012; Moustakas & Heldin 2005).

De este modo, las respuestas celulares inducidas por la señalización de TGF β son el resultado de la combinación dinámica de ambas cascadas que pueden relacionarse y modularse mutuamente,

siendo ambas también influenciadas por otras rutas de señalización como TNF, RAS, WNT, Hedgehog y Notch (Guo & Wang 2009).

5.2. Funciones biológicas de TGFβ y su relación con el cáncer

TGFβ posee un papel dual y opuesto durante el proceso de tumorigénesis: es un potente supresor de tumores en el contexto de células pre malignas (etapa temprana) pero potencia la invasión y la metástasis en el contexto de células en un estado de tumorigenicidad más avanzado (Massagué 2008). Del mismo modo, en función del microambiente, TGFβ puede inducir proliferación celular o inhibir el crecimiento, inducir diferenciación o potenciar la pluripotencialidad y las características de célula madre. Es lo que conocemos como la **paradoja de la acción de TGFβ**.

- Inhibición de la proliferación.

TGFβ provoca inhibición del crecimiento en la mayoría de los tipos celulares entre los que se incluyen células del sistema inmunitario, epiteliales, endoteliales, hematopoyéticas (Derynck et al. 2001). En células epiteliales, TGFβ activa la transcripción de los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas CDK1A y CDK21 que codifican respectivamente a p21^{CIP1} y p15^{INK4B} provocando una parada del ciclo en fase G1 (Gomis et al. 2006). Por otro lado, TGFβ inhibe la expresión del factor de transcripción Myc (requerido para la proliferación celular y el crecimiento) y de miembros de la familia ID (Heldin et al. 2009). Sin embargo, muchos tumores son capaces de reducir los efectos inhibidores del crecimiento de TGFβ respondiendo de manera pro-tumorigénica a la presencia del ligando. En este sentido, se ha observado en tumores gástricos un incremento en la expresión de determinados miRNAs (miR-106b, miR93 y miR-25) que interfieren con la expresión de p21^{CIP1} y la proteína pro-apoptótica Bim, correlacionado con la pérdida de actividad supresora de tumores de TGFβ.

- Señalización de apoptosis.

La habilidad de los miembros de la familia de TGFβ para inducir apoptosis es fundamental durante la embriogénesis y como parte de su actividad supresora de tumores. De hecho, La actividad proapoptótica de TGFβ se ha descrito en múltiples tipos celulares y aunque los mecanismos implicados en este proceso difieren en función del modelo celular, la mayoría parecen depender de la acción de las proteínas SMADs.

TGFβ promueve apoptosis en hepatocitos (Sánchez y Fabregat) y linfocitos-B a través de la transcripción dependiente de SMADs de la fosfatasa MKP2 que potencia el efecto pro-apoptótico del miembro de la familia Bcl-2 Bim (Ramesh et al. 2008). En células de cáncer de colon, TGFβ inhibe la

expresión de survivina y la actividad de AKT, permitiendo la apoptosis (Wang et al. 2008). Por otro lado, TGF β a través de la activación de SMAD2-3 y en colaboración con los factores de transcripción Rb y E2F4, suprime el efecto de la survivina induciendo apoptosis en células epiteliales de próstata (Yang et al. 2008). Por último, se ha descrito que la E3 ligasa TRAF6 se une constitutivamente al T β RI o ALK5. La oligomerización dependiente de ligando del complejo receptor (T β RII- T β RI), provoca la auto-poliubiquitinación de TRAF6 que se activa y poliubiquitina a la MAP quinasa TAK1, la cual fosforila y activa a MKK3 o MKK6 que a su vez activan a p38. La activación de esta ruta se produce de manera independiente de R-SMADs y SMAD 7 actúa como proteína de soporte que facilita la activación de esta cascada de MAP quinasa y la inducción de apoptosis, la inhibición del crecimiento y la EMT (Sorrentino et al. 2008; Yamashita et al. 2008).

- Inducción de EMT.

TGF β es uno de los inductores más potentes y mejor estudiados de transición epitelio-mesénquima en la mayor parte de los tejidos epiteliales y endoteliales y por ello está vinculado a la regulación de procesos como la cicatrización, la fibrosis y el cáncer (Lamouille et al. 2014). La mayor parte de los sistemas en los que se ha observado EMT, ésta se encuentra regulada por TGF β 1, mientras que TGF β 2 principalmente controla EndMT en el desarrollo del corazón y TGF β 3 media EMT en el desarrollo del paladar (Gonzalez & Medici 2014).

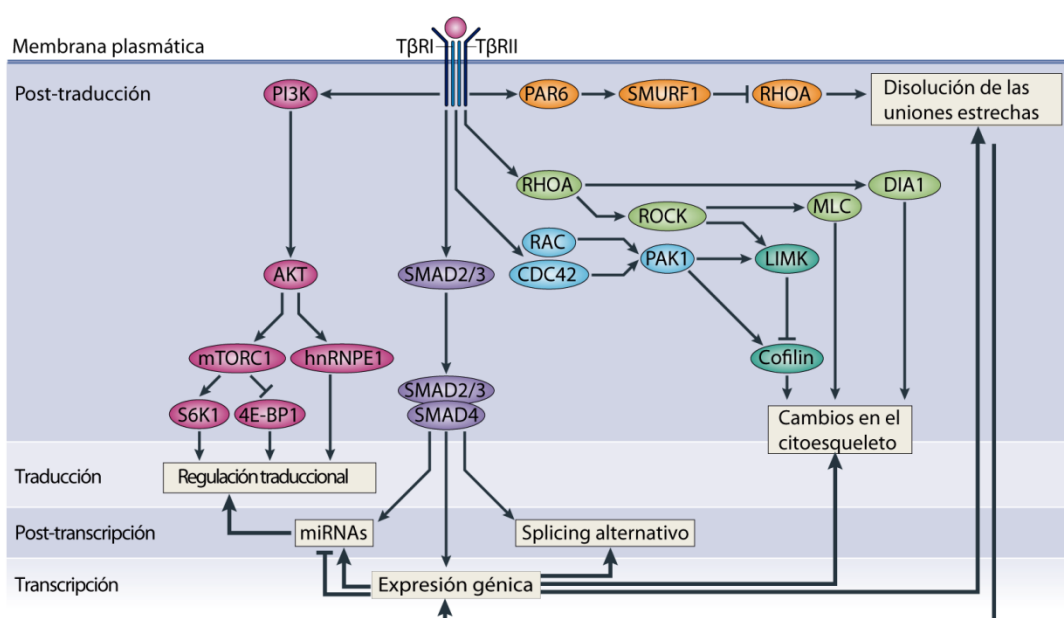


Figura 25: Mecanismo molecular de inducción de EMT por TGF β . Adaptado de "Molecular mechanisms of epithelial to mesenchymal transition" (Lamouille et al. 2014)

Por sí solo, el tratamiento con TGF β es suficiente para inducir EMT en células epiteliales in vitro y en su inducción se ven implicadas tanto la vía canónica como la independiente de SMADs, existiendo también interacción entre ambas vías (**Figura 25**) (Derynck et al. 2014).

De esta forma, a través de la ruta de las SMADs, TGF β activa e incrementa la expresión de los EMT-TFs: Snail, Slug, Zeb1 y Twist y de miRNAs (miR-34 y miR200). Además SMADs activadas por TGF β también son responsables de otros cambios que se producen en la expresión de genes durante el proceso de EMT en el que no se requiere la acción de los EMT-TFs. SMADs pueden activar directamente la expresión de genes mesenquimales como aquellos que codifica para la Fibronectina, la vimentina y el colágeno (Lamouille et al. 2014; Moustakas & Heldin 2005).

Por su parte, y de manera complementaria a la señalización dependiente de SMADs, las vías no canónicas señalizan a través de las rutas de RHO GTPasas, PI3K y MAPK, las cuales también contribuyen al proceso de EMT promoviendo la remodelación del citoesqueleto y la disolución de las uniones célula-célula (Xu et al. 2009). La activación de RHO, RAC y CDC42 GTPasas promueve la reorganización de la actina, y la formación de lamelipodia y filopodia (Ridley et al. 2011). Por otro lado, PAR6 interacciona con los receptores de TGF β en la uniones estrechas, reclutando a la E3 ubiquitín ligas SMURF1 que promueve la Ubiquitinación local de RHOA y la disolución de las uniones estrechas (Ozdamar et al. 2005)

En células epiteliales, TGF β también activa la ruta PI3K-AKT-mTORC1/mTORC2 (*del inglés, mammalian TOR complex 1*) y la inhibición farmacológica de PI3K impide la EMT inducida por TGF β . En esta ruta, mTORC1 contribuye a incrementar el tamaño celular, la síntesis de proteínas, la invasividad y la motilidad, mientras que mTORC2 es necesario para la transición desde un fenotipo epitelial a uno mesenquimal (Lamouille & Derynck 2007; Bakin et al. 2000; Lamouille et al. 2012).

6. Estrés en el retículo endoplasmático y UPR.

El retículo endoplasmático (RE) es una compleja y dinámica red celular tridimensional de membranas tubulares, sacos y cisternas, fuertemente interconectadas entre sí. El RE se extiende por toda la célula, abarcando desde la membrana externa de la envoltura nuclear hasta las vesículas secretoras, llegando a representar más del 50% de las membranas de una célula. Tradicionalmente, el RE ha sido dividido en 3 dominios: **La envoltura nuclear**, **el RE liso** (sin ribosomas asociados y túbulos muy curvados e irregulares) y **el RE rugoso** (con cisternas aplanadas y numerosos ribosomas asociados) (Baumann & Walz 2001).

El retículo endoplasmático participa en una gran variedad de funciones celulares, como la síntesis y maduración de proteínas de membrana y secretoras, la biosíntesis de fosfolípidos, colesterol y esteroides, la degradación de glucógeno y el mantenimiento de la homeostasis del Calcio (Braakman & Bulleid 2011) (**Figura 26**).

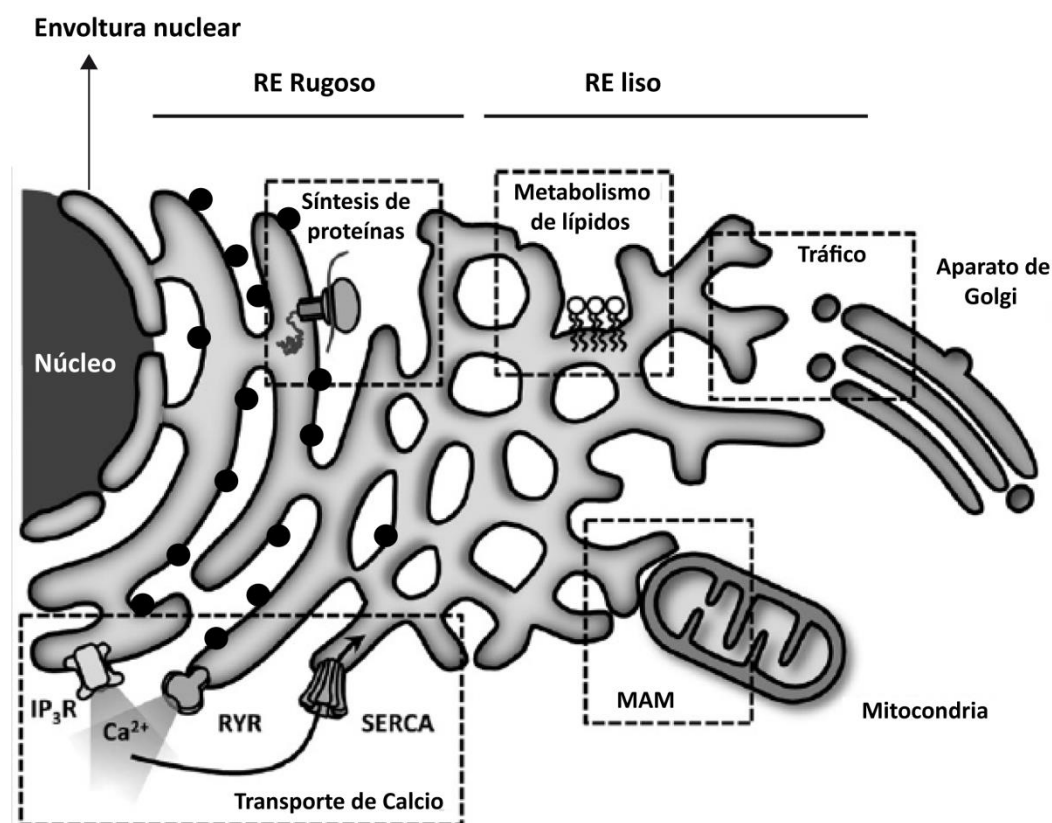


Figura 26: Estructura y funciones generales del Retículo Endoplasmático (RE). Adaptado de “Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: Dynamics and Metabolic Integration” (Bravo et al. 2013)

No obstante, su función principal es el **ensamblaje y maduración de proteínas** sintetizadas en los ribosomas presentes en la cara citoplasmática del RE rugoso, que posteriormente van a atravesar toda una ruta secretora, durante la cual se producirán modificaciones post-traduccionales que comprenden desde el plegamiento y la oligomerización proteica hasta la glicosilación y formación de puentes disulfuro y finalmente el transporte a otros orgánulos. Por esta razón, en el retículo endoplasmático existe todo un complejo sistema de chaperonas, foldasas, cofactores, enzimas y mecanismos de control de calidad que van a permitir el correcto plegamiento de las proteínas que junto con unas condiciones intraluminales óptimas (estado redox, niveles de Ca^{2+} , nutrientes...) garantiza una producción eficiente de éstas (Bravo et al. 2013; Dufey et al. 2015).

El estrés en el retículo endoplasmático, se produce como consecuencia de una alteración en la homeostasis celular, que puede estar provocada por diversos estímulos (desarrollo de células secretoras especializadas como células de plasma o β -pancreáticas, alteraciones en el metabolismo, restricción de nutrientes, hipoxia, infecciones de patógenos, alteraciones en los niveles de Ca^{2+} ... (Rutkowski & Kaufman 2004)), que van a afectar al correcto funcionamiento del RE y con ello al plegamiento de las proteínas, ocasionando una acumulación de proteínas mal plegadas que la célula intentará reducir mediante la activación de un mecanismo de degradación de proteínas por el proteasoma conocido como **ERAD** (*del inglés, ER-Associated Degradation*) y la inducción de un mecanismo adaptativo conocido como respuesta a proteínas mal plegadas o **UPR** (*del inglés, Unfolded Protein Response*) que intentará solventar el estrés y promover la supervivencia celular (Jäger et al. 2012; Wang & Kaufman 2014). Sin embargo, si el estrés perdura o no se resuelve, la célula se dañará de manera irreversible y será eliminada por apoptosis (Urrea et al. 2013a).

Por tanto, **la respuesta a proteínas mal plegadas o UPR** engloba un conjunto de rutas de señalización muy conservadas, compuesta de proteína sensoras del estado celular (localizadas en la membrana de RE) y proteínas efectoras responsables de transmitir la señal a otros compartimentos celulares (citósol y núcleo), controlando así la homeostasis celular. De este modo, un desequilibrio entre la cantidad de proteínas sin plegar que entra en el RE y la capacidad de la maquinaria celular encargada de realizar esta función (estrés en el RE) pone en marcha 3 posibles respuestas (Ron & Walter 2007):

- La primera es una adaptación transitoria que consiste en una reducción de la carga de proteínas que entra en el RE para lo que se produce una **inhibición de la síntesis y transporte de proteínas al RE**.
- La segunda implica un incremento en la capacidad de plegamiento de proteínas del RE. Se trata de una respuesta a largo plazo, que requiere de la **activación transcripcional de genes diana de la UPR** entre los que se incluyen aquellos que forman parte de la maquinaria de plegamiento del RE.
- Por último, si no se logra recuperar la homeostasis se induce la **muerte celular** con la intención de proteger al organismo.

6.1. Rutas de señalización de la UPR.

En células de mamíferos se han descrito tres proteínas sensoras situadas en la membrana del RE, cada una de las cuales conforma una ruta de señalización de la UPR distinta: **IRE1** (*del inglés, Inositol-*

Requiring Enzyme 1), **ATF6** (del inglés, *Activating Transcription Factor 6*) y **PERK** (del inglés, *Protein kinase RNA (PKR)-like ER Kinase*) (Schröder & Kaufman 2005) (**Figura 27**).

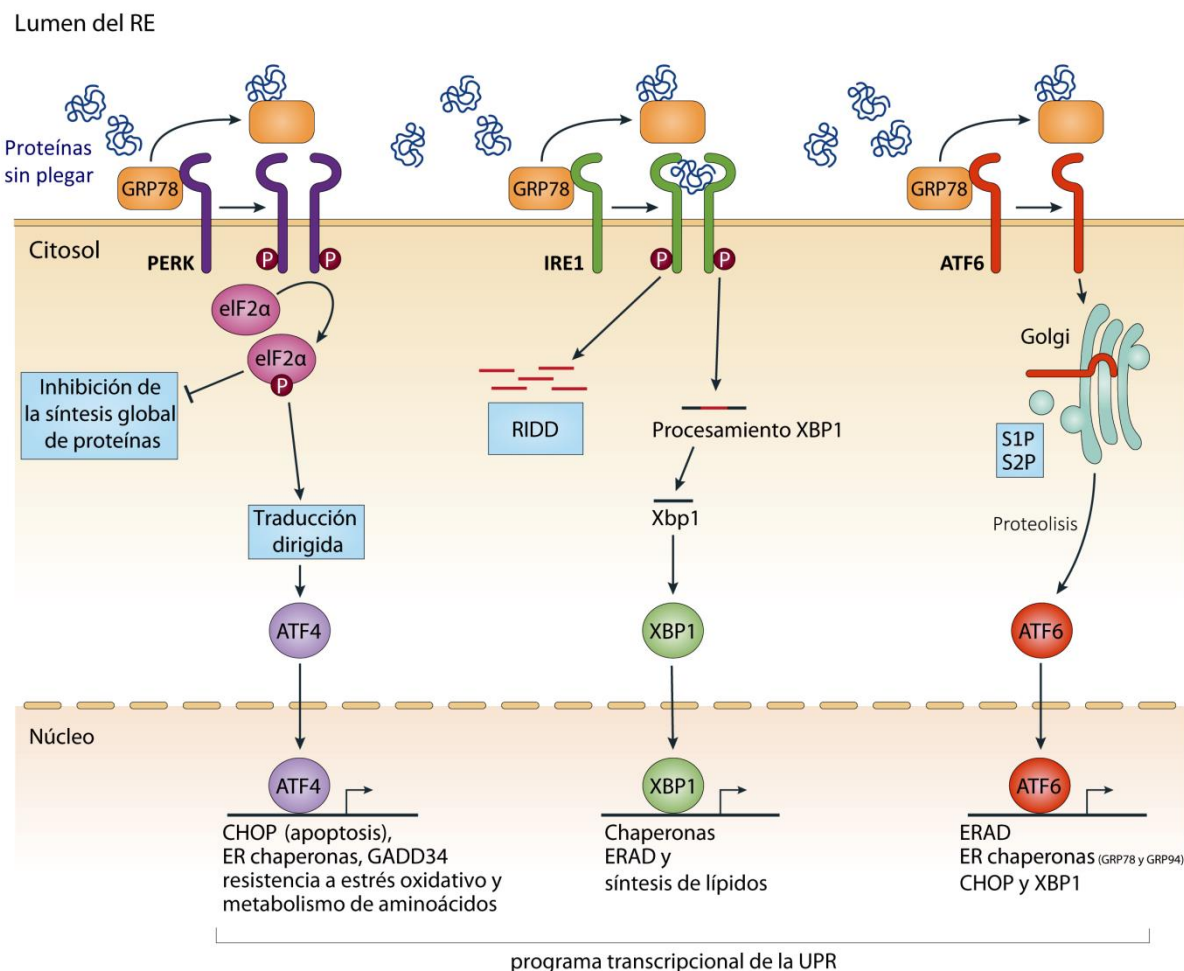


Figura 27: Respuesta celular a estrés en el retículo endoplasmático en mamíferos (UPR). Adaptado de “Bacteria, the endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: friends or foes?” (Celli & Tsolis 2014)

6.1.1. Sensando el estrés: Papel de GRP78 /BiP.

La activación de los tres sensores de la UPR depende de la separación de la proteína chaperona **GRP78/BiP**. En células no estresadas, los dominios luminales de PERK, IRE-1 y ATF6 se encuentran asociados con la chaperona GRP78/BiP que los mantiene inactivos. Cuando la situación de estrés se produce, GRP78 se disocia de estas proteínas permitiendo su señalización (Bertolotti et al. 2000; Shen et al. 2002).

La región de GRP78 que se une a IRE-1 y PERK, es la región peptídica que también se une al área hidrofóbica expuesta de las proteínas sin plegar. Por ello, se propone que en condiciones normales, hay uno elevados niveles de GRP78 (es la proteína más abundante en el lumen del RE), y los dominios luminales de las tres proteínas sensoras son rápidamente asociados con GRP78. Sin embargo, GRP78 es una chaperona y tiene preferencia por las proteínas mal plegadas, de manera que cuando hay una acumulación de este tipo de proteínas, GRP78 se separa de las proteínas sensoras, uniéndose a las proteínas mal plegadas, quedando PERK e IRE-1 libres para homodimerizar y autofosforilarse activando toda su cascada de señalización y ATF6 quedaría libre para desplazarse al aparato de Golgi y ser cortada proteolíticamente (a continuación se detallan los mecanismos de activación y señalización de cada una de las proteínas sensoras) (Rutkowski & Kaufman 2004).

6.1.2. Señalización de IRE-1.

Es la rama de la UPR evolutivamente mejor conservada y estudiada. En mamíferos se han descrito dos isoformas: IRE-1 α (denominada IRE-1) expresada en todos los tejidos e IRE-1 β cuya expresión está limitada a los tractos gastrointestinal y respiratorio.

IRE-1 es una proteína transmembrana de tipo I, con el extremo N-terminal en la región luminal y en su parte citosólica un dominio quinasa y otro C-terminal RNasa, lo que hace de esta proteína una quinasa/endoribonucleasa bifuncional (Ron & Hubbard 2008; Walter et al. 2011).

En respuesta a proteínas mal plegadas, GRP78 se disocia e IRE-1 oligomeriza en el plano de la membrana permitiendo la trans-autofosforilación de los dominios quinasa yuxtapuestos que se activan por completo, activando también el dominio ribonucleasa que va a cortar específicamente en dos posiciones, un RNA mensajero (RNAm) que codifica un factor de transcripción específico de la UPR: **XBP1** (*del inglés, X-ox Binding Protein-1*). (**Figura RE_2**). El producto de este “splicing” alternativo, denominado **XBP1_s**, (ha perdido un intrón) es muy estable e induce la expresión de toda una serie de genes involucrados en numerosos procesos de la UPR: controla genes implicados en el plegamiento y secreción de proteínas, la degradación de proteínas mal plegadas (ERAD) y la síntesis de lípidos (Lee et al. 2003; Hetz et al. 2011).

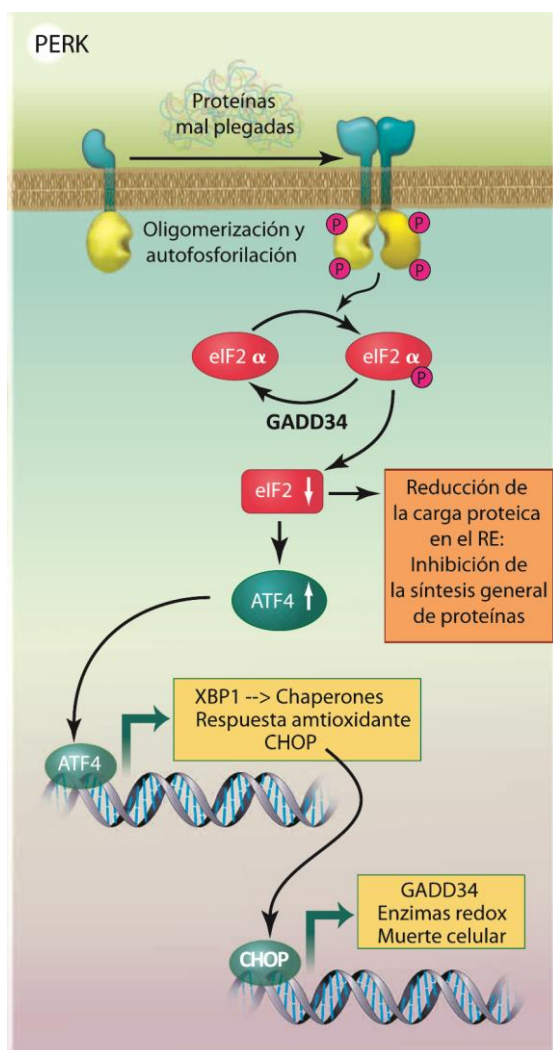
El precursor de XBP1 también es traducido, generando una proteína más lábil que reprime la expresión de genes diana de la UPR (Ron & Walter 2007).

Recientemente se ha demostrado como la prolongación experimental de la señalización de IRE-1 durante estrés en el RE puede promover la supervivencia celular. De este modo, la señalización de

IRE-1 supone un importante mecanismo de adaptación que trata de establecer un equilibrio entre la capacidad de plegamiento del RE y la demanda de proteínas plegadas.

6.1.3. Señalización de PERK.

PERK al igual que IRE-1 es un proteína transmembrana tipo I, con un dominio serina/treonina quinasa citosólico y un extremo N-terminal luminal (sensor).



En condiciones de estrés en el RE, GRP78 se une a proteínas mal plegadas o sin plegar, permitiendo la oligomerización y auto-fosforilación de PERK que se activa y fosforila al factor de iniciación de la traducción **eIF2α**, lo que indirectamente inactiva a **eIF2α** provocando una inhibición de la síntesis global de proteínas (Walter et al. 2011). De esta manera, PERK reduce el flujo de proteínas en el RE reduciendo el estrés. Sin embargo, algunos RNAm contienen una secuencia en su extremo 5' conocidas como uORFs (*del inglés, short Open Reading Frames*), que en condiciones normales impiden la traducción pero que les permite traducirse de manera preferente cuando **eIF2α** se encuentra inactivo. El más conocido de estos transcritos es el factor de transcripción **ATF4** (*del inglés, Activating Transcription Factor 4*), miembro de la familia de factores de transcripción C/EBP (CCAAT/Enhancer Binding Protein) y cuya traducción se ve inducida en condiciones limitantes de **eIF2** (Schröder & Kaufman 2005).

Figura 28: Activación y señalización de PERK en respuesta a estrés en el RE. Adaptado de "The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation" (Walter et al. 2011)

ATF4 controla la expresión de genes implicados en plegamiento, respuestas redox, autofagia, metabolismo de aminoácidos que van a ayudar a recuperar la homeostasis y asimismo, va a inducir apoptosis a través de la transcripción de **CHOP** (Chevet et al. 2015).

CHOP (*del inglés, C/EBP Homologous Protein*) es un factor de transcripción que controla genes que codifican proteínas implicadas en apoptosis, aunque también va a participar en la recuperación de la homeostasis mediante la inducción de la expresión de **GADD34** (*del inglés, Growth Arrest and DNA Damage-inducible 34*), un activador de la proteína fosfatasa, PP1C, la cual va a contrarrestar a PERK mediante la defosforilación de EIF2 α , restaurando la síntesis global de proteínas e inhibiendo la traducción de ATF4 (Novoa et al. 2001; Marciniak et al. 2004) (**Figura 28**).

Entre las respuestas adaptativas inducida por la señalización de PERK, se encuentra el factor de transcripción **NRF2**. En condiciones basales, NRF2 se mantiene inactivo e interaccionando con la proteína KEAP1. PERK activo puede fosforilar directamente a NRF2, que se liberaría de KEAP1 y translocándose al núcleo donde promueve la transcripción de proteínas antioxidantes (Cullinan et al. 2003).

6.1.4. Señalización de ATF6.

ATF6 es un factor de transcripción anclado en la membrana cuya activación controla principalmente el plegamiento de proteínas en el RE y las maquinarias de control de calidad (Chevet et al. 2015).

La acumulación de proteínas mal plegadas dará lugar a la disociación de GRP78 y ATF6 será transportado hasta el aparato de Golgi donde será procesado por las proteasas de sitio, S1P y S2P que van a eliminar los dominios luminal y transmembrana, liberando el fragmento citosólico N-terminal ATF6(N), que será translocado hasta el núcleo para activar genes diana de la **UPR** (**Figura 27**) (Haze et al. 1999; Chen et al. 2002).

Entre las dianas de ATF6 principalmente encontramos proteínas implicadas en el plegamiento de las proteínas (chaperonas GRP78 y GRP94), la proteína disulfuro isomerasa, proteínas implicadas en la ERAD y XBP1 (Walter et al. 2011; Yoshida et al. 2001).

6.1.5. Control temporal e interrelación entre los tres brazos de la UPR.

Aunque los tres brazos de la UPR se activan tras la disociación de GRP78, el tiempo de activación, duración del estado activo y señalización son diferentes para cada sensor (PERK, IRE-1 y ATF6).

Tras un estímulo de estrés en el RE, la primera ruta que se activa es la responsable de la inhibición de la síntesis global de proteínas mediada por PERK, ya que EIF2 α es un sustrato activo de PERK y por tanto no requiere de una translocación nuclear, transcripción o traducción.

El procesamiento de ATF6 también ocurre bastante rápido tras la exposición a estrés, sin embargo, la expresión de los genes controlados por esta proteína sensora, requieren la translocación nuclear de

su dominio citoplasmático, la inducción de la transcripción y la síntesis de proteínas (principalmente chaperonas), por lo que el incremento en la capacidad de plegamiento de proteínas supone la segunda etapa de la UPR.

La fosforilación de EIF2 α por PERK, también permite la traducción de ATF4. Sin embargo, EIF2 α puede también fosforilarse en respuesta a otros tipos de estrés celular a través de las quinasas GCN2, PKR y HR1 (Clemens 2001), por lo que los genes regulados por ATF4 son importantes también para la recuperación de otros tipos de estrés.

Por último tiene lugar la activación completa de la respuesta de IRE-1, que se encuentra retrasada debido a que el incremento en la expresión del RNAm de XBP1 depende del factor de transcripción ATF6 (Yoshida et al. 2001). Por esta razón, la ruta dependiente de XBP1 se activa una vez se han inducido los programas transcripcionales de la UPR, esto es después de las rutas de PERK y ATF6. De este modo la degradación de proteínas (ERAD) representa el tercer proceso de la UPR (Rutkowski & Kaufman 2004).

6.2 UPR en la supervivencia y en la muerte celular.

La UPR configura toda una red de eventos de señalización celular muy dinámica y flexible, que responde a una amplia variedad de estímulos capaces de alterar el estado metabólico basal de la célula. Normalmente, en procesos fisiológicos que requieren una elevada tasa de síntesis proteica y secreción, como por ejemplo la transición epitelio-mesénquima (Feng et al. 2014), la activación de una UPR adaptativa puede ser sostenida en el tiempo sin que ello suponga la señalización de rutas de muerte celular. (Tabas & Ron 2011). No obstante, cuando el estrés en el RE supera un determinado límite (que dependerá del tipo y del contexto celular), la UPR iniciará un mecanismo de muerte celular.

De este modo, como ya mencionamos anteriormente, la primera etapa o la reacción inmediata de la activación de la UPR es **adaptativa**, promoviendo la recuperación de la homeostasis y la supervivencia celular, a través de mecanismos que mejoran la capacidad de plegamiento de proteínas y reducen el flujo de entrada de proteínas al retículo.

Pero, si el estrés prevalece y no se consigue recuperar la homeostasis, se pone en marcha una segunda etapa en la cual, la propia UPR va a activar mecanismos destinados a inducir **muerte celular** (Figura 29) (Hetz 2012).

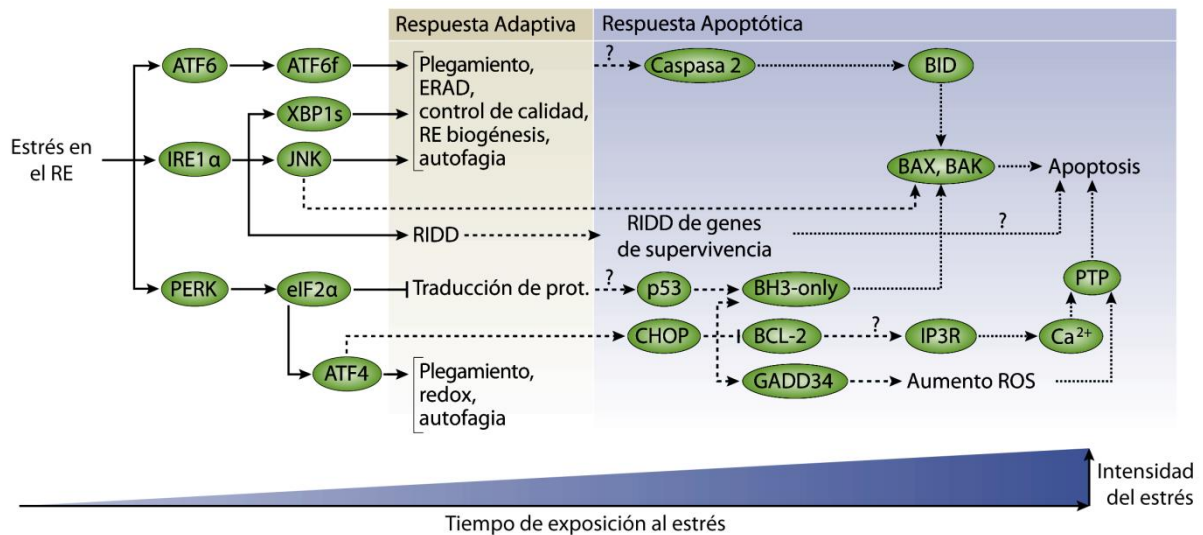


Figura 29: Destino celular tras estrés en el RE. Adaptado de "The unfolded protein response: controlling cell fate decision under ERstress and beyond" (Hetz 2012)

6.2.1. Regulación de la apoptosis por la UPR.

El mecanismo principal de inducción de muerte celular por estrés en el RE es la apoptosis, aunque no se descarta que otros tipos de muerte celular como necrosis, necroptosis o autofagia puedan contribuir a la eliminación de células en estas condiciones (Urrea et al. 2013a).

Se ha mostrado en diversos tipos celulares y con distintos inductores que la activación de la UPR induce la activación de caspasas y la apoptosis fundamentalmente por la ruta mitocondrial (Upton et al. 2008; Puthalakath et al. 2007; Li et al. 2006), la cual es regulada por la familia de proteínas Bcl-2 (apartado proteínas de la familia Bcl-2).

- Señalización de PERK en la regulación de apoptosis inducida por estrés en el RE.

En condiciones prolongadas de estrés en el RE, PERK induce muerte celular. De hecho, la activación constitutiva de PERK, pero no de IRE-1 induce parada del crecimiento y muerte celular en determinados modelos celulares (Lin et al. 2009). Uno de los principales eventos implicados en esta respuesta pro-apoptótica es la inducción del factor de transcripción CHOP.

El mecanismo molecular implicado en esta respuesta apoptótica implica la regulación transcripcional de diversos genes (**Figura 30**). Entre ellos se encuentra **GADD34** que potencia la inducción de especies reactivas de oxígeno (ROS), promoviendo la síntesis de proteínas e induciendo proteotoxicidad (Kojima et al. 2003).

Por otro lado, la ruta mejor descrita por su papel crucial en la inducción de apoptosis tanto *in vitro* como *in vivo*, es la ruta **PERK/ATF4/CHOP**. CHOP es el factor de transcripción más ampliamente implicado en la inducción de apoptosis por estrés en el RE. Por ello es importante mencionar que no en todos los casos de muerte celular mediada por CHOP requieren de la participación de PERK y ATF4, ya que CHOP también es una diana transcripcional de ATF6 y XBP1 (Iurlaro & Muñoz Pinedo 2015)

El mecanismo más estudiado de inducción de apoptosis por CHOP es a través de la regulación de diversos miembros de la familia Bcl-2. En condiciones de estrés en el RE, CHOP disminuye la expresión de Bcl-2 induciendo apoptosis (McCullough et al. 2001). CHOP también puede inducir la expresión de proteínas BH3-only como Bim, Puma y Noxa (Puthalakath et al. 2007; Reimertz et al. 2003; Gupta et al. 2012). Además, la hipersensibilidad a estrés en el RE de células deficientes en PERK es recatada mediante el silenciamiento de Noxa, lo que sugiere un papel fundamental de la familia de proteínas Bcl-2 en el proceso de muerte por estrés en el RE.

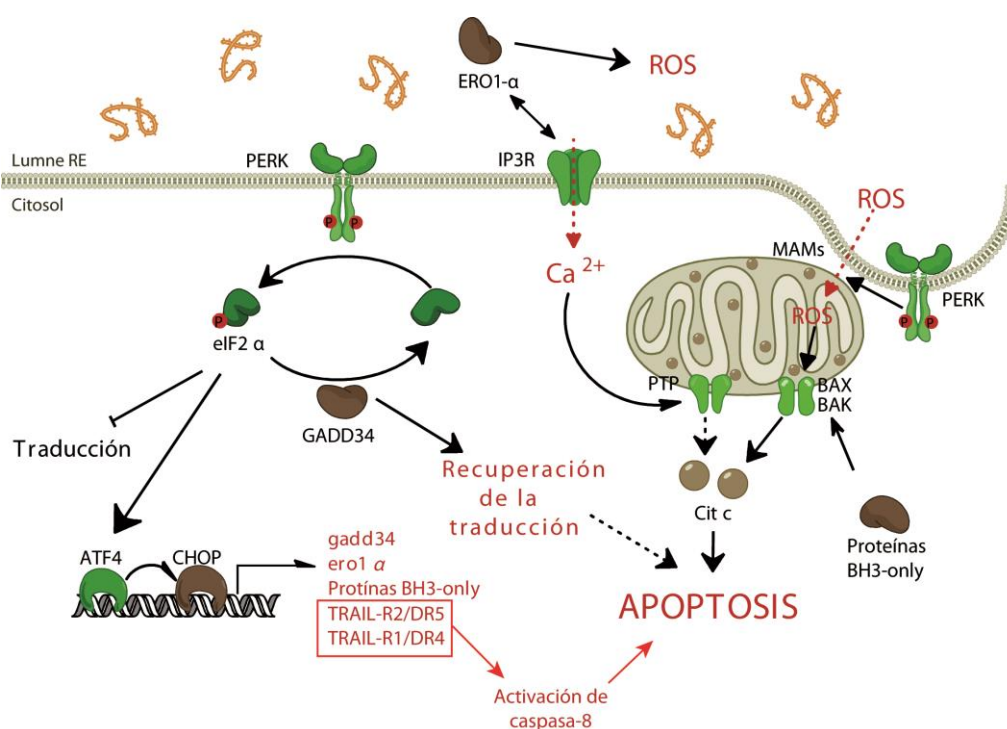


Figura 30: Señalización de PERK en la inducción de apoptosis por estrés en el RE. Adaptado de “When ER stress reaches a dead end” (Urra et al. 2013b)

Otro posible mecanismo implicado en la apoptosis inducida por CHOP es la modulación del estado oxidativo del retículo endoplasmático. La sobreexpresión de CHOP, induce la disminución de glutatión y un incremento desmesurado de los ROS, posiblemente mediado por la oxidasa del RE: ERO1α (gen

diana de CHOP), responsable de la hiper-oxidación del lumen del RE en respuesta a estrés crónico. De hecho, el silenciamiento de ERO1 α en *C.elegans* protege a los animales del efecto de la Tunicamicina (antibiótico que inhibe la N-glicosilación) (Marciniak et al. 2004). Además, estudios recientes han relacionado la liberación de calcio en el citoplasma con la apoptosis inducida por CHOP. De este modo, la activación de ERO1 α activaría los receptores IP₃R promoviendo así el incremento en los niveles de Calcio citoplasmático que contribuirían a la apoptosis favoreciendo la permeabilización de la mitocondria (Li et al. 2009; Tsujimoto et al. 2006).

CHOP también puede regular la expresión de otros genes diana directamente implicados en apoptosis. Este es el caso del receptor pro-apoptótico de TRAIL, TRAIL-R2/DR5 cuya inducción ha sido descrita en respuesta a estrés en el RE en diversas líneas celulares (Yamaguchi & Wang 2004; Martín-Pérez et al. 2014; Lu et al. 2014). En concreto uno de estos estudios demuestra la co-existencia de señalización pro y antiapoptótica mediada por la UPR (Lu et al.). En este estudio, el estrés en el RE induce un incremento de TRAIL-R2/DR5 mediado directamente por CHOP y una inducción de un RNAm de TRAIL-R2/DR5 no funcional mediado por IRE-1 α que favorece que las células se adapten al estrés. De este modo, en condiciones de estrés moderado o reversible, CHOP estaría induciendo la expresión de TRAIL-R2/DR5 mientras que IRE-1 estaría inhibiendo la expresión del este mismo receptor, pero cuando el estrés persiste, TRAIL-R2/DR5 se acumula induciendo su activación de manera independiente de ligando y la apoptosis a través de caspasa-8 (Lu et al. 2014). Por otro lado, en células de cáncer de pulmón, también se ha observado una activación del receptor de muerte TRAIL-R1/DR4 en respuesta a estrés en el RE. Se ha descrito que CHOP interacciona con la forma fosforilada del factor de transcripción JUN en un complejo que se une al sitio de unión de AP-1 en la región promotora del gen TRAIL-R1/DR4 lo que favorece la muerte por taspigargina y Tunicamicina (Li et al. 2015). Por último, entre los genes diana de CHOP también encontramos a la proteína TRB3 la cual se ha visto que es necesaria para la completa activación de la apoptosis en células Hela y HEK293 tratadas con Tunicamicina (Ohoka et al. 2005).

Por tanto, podemos observar la existencia de una importante cantidad de datos que sugieren un papel crucial para PERK y CHOP en la inducción de los mecanismos de muerte celular inducidos por estrés en el RE. Sin embargo, células deficientes en PERK y CHOP aún son capaces de experimentar apoptosis lo que nos indica la existencia de otros puntos de control y vías de señalización que median este proceso en respuesta a estrés (Urrea et al. 2013a).

- Señalización de IRE-1 en la regulación de apoptosis inducida por estrés en el RE.

Tal y como hemos analizado anteriormente, la ruta de IRE-1 α tiene un importante papel en la supervivencia celular que ejecuta favoreciendo al expresión de un conjunto de genes implicados en

el plegamiento de las proteínas y en las maquinarias de control de calidad. Este tipo de respuesta adaptativa podemos observarla en células que expresan constitutivamente una forma activa de IRE-1 α (Lin et al. 2007).

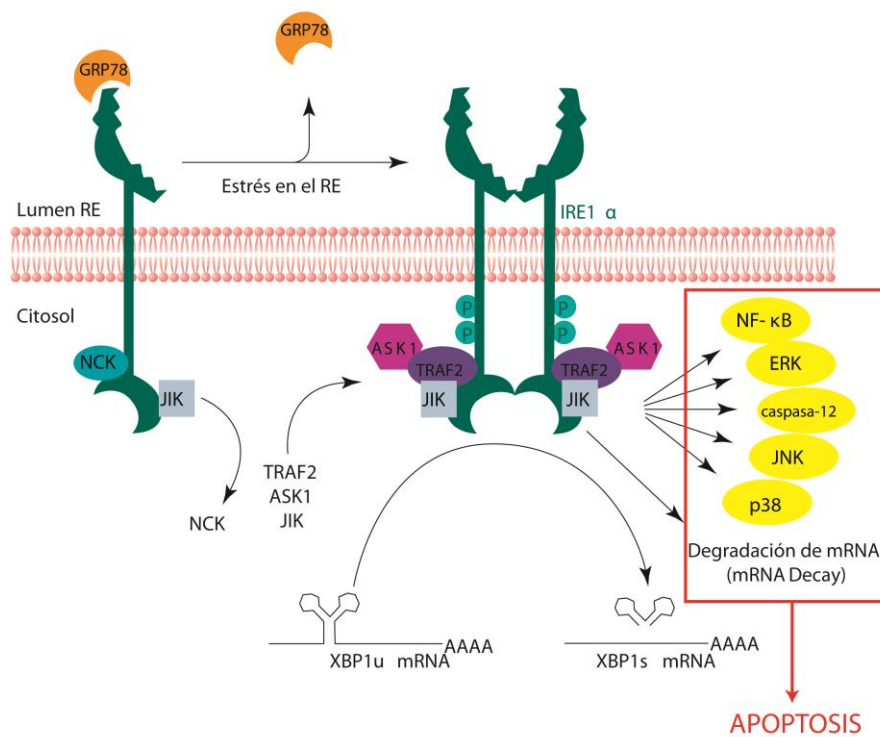


Figura 31: Señalización de IRE-1 α en la inducción de apoptosis por estrés en el RE. Adaptado de “Modulating stress responses by the UPRosome: A matter of life and death” (Woehlbier & Hetz 2011)

Sin embargo, en contraste con su papel favoreciendo la supervivencia celular, existen algunas referencias que muestran como el mantenimiento de la señalización de IRE-1 α podría también presentar un papel pro-apoptótico (Han et al. 2009). En este sentido, se ha descrito que la amplitud y la duración de la señalización de IRE-1 α se controla a través de una plataforma denominada **UPRosoma** en la que diferentes proteínas moduladoras y adaptadoras interaccionan de manera dinámica, regulando la relación entre la maquinaria apoptótica y de supervivencia (Woehlbier & Hetz 2011).

De este modo, IRE-1 α forma complejo con TRAF2 induciendo la activación de la ruta ASK1/JNK que regula y activa la apoptosis aunque también podría participar en necrosis en respuesta a inductores de estrés en el RE (Urano et al. 2000; Saveljeva et al. 2015). Además, IRE-1 α , en complejo con TRAF2/IKK, activa NF κ B induciendo también la muerte celular (**Figura 31**) (Hu et al. 2006).

Por último, junto con el splicing de XBP-1, la actividad endoribonucleasa de IRE-1 α también puede degradar un conjunto de RNA mensajeros en un proceso conocido como RIDD (*del inglés, Regulated IRE-1 α -Dependent Decay*) (Hollien et al. 2009) y promover la muerte celular mediante la degradación

de RNAm de proteínas anti-apoptóticas y chaperonas fundamentales del RE como GRP78/BiP (Hollien & Weissman 2006), aunque también se ha relacionado con la degradación de proteínas pro-apoptóticas como TRAIL-R2/DR5 (Lu et al. 2014) lo que estaría en consonancia con su papel en la supervivencia celular.

- Señalización de ATF6 en la regulación de apoptosis inducida por estrés en el RE

Por lo general, la respuesta a ATF6 ha sido relacionada con mecanismos de supervivencia y de adaptación al estrés y su único posible papel en la inducción de apoptosis solo se debería a una regulación de la expresión de CHOP (Yoshida et al. 2000). Sin embargo se ha demostrado en una línea de mioblasto, que ATF6 podría estar indirectamente reduciendo la expresión de la proteína anti-apoptótica de familia Bcl-2: Mcl-1, favoreciendo así la apoptosis inducida por estrés en el RE (Morishima et al. 2011).

6.3. UPR y cáncer

El estrés en el RE es una de las características implicadas en diversas enfermedades debido fundamentalmente a las consecuencias del proceso de UPR. Tal y como hemos mencionado anteriormente, si el estrés es muy intenso o prolongado, la célula es incapaz de recuperar su homeostasis y se inicia un programa que promueve la muerte celular. Este es el caso de la retinitis pigmentosa, un tipo de ceguera hereditaria provocada por la expresión de una proteína mal plegada mutante que se produce durante el desarrollo de la retina, provocando de este modo, la degeneración de la retina por apoptosis. Por otro lado, el papel citoprotector de la UPR facilita el rápido crecimiento celular, favoreciendo la progresión tumoral (Walter et al. 2011).

Así, debido a que tanto el estrés en el retículo endoplasmático como la activación de la UPR han sido implicadas en las patologías de prácticamente todas las enfermedades neurodegenerativas y en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer (Wang & Kaufman 2014), se ha establecido el estrés en el RE como una nueva diana terapéutica para el tratamiento de diversas enfermedades.

El microambiente tumoral se caracteriza por una pobre vascularización, bajos niveles de oxígeno, privación de nutrientes y pH ácido, condiciones todas inductoras de estrés en el RE. Este microambiente estresante, induce la activación de la UPR, que en primera instancia actuará como mecanismo de adaptación al estrés promoviendo la supervivencia de las células tumorales, incrementando su agresividad y la resistencia a agentes quimioterapéuticos. En este sentido, la participación de la UPR en el crecimiento tumoral ya ha sido bien definida y comprobada en diversos modelos preclínicos de cáncer. Sin embargo, nuevos conceptos comienzan a emerger relacionando

la señalización mediada por estrés en el retículo con otros aspectos de la biología del cáncer, entre los que se incluyen la transformación oncogénica, la inestabilidad genómica, la inmunomodulación y la metástasis (Wang & Kaufman 2014; Clarke et al. 2014).

6.3.1. UPR en la progresión tumoral.

El desarrollo del cáncer implica un crecimiento acelerado de los tumores, lo que requiere un mayor aporte de nutrientes y un consumo de oxígeno que normalmente supera a la capacidad de las estructuras vasculares lo que genera condiciones de estrés en el microambiente.

Diversos estudios, muestran el incremento en la expresión de chaperonas del RE como factores importantes implicados en la progresión tumoral. Es el caso de **GRP78 (diana transcripcional de ATF6)**, que se encuentra sobreexpresada en diversos tumores y cuya expresión es necesaria para la supervivencia de la célula tumoral. Esta sobreexpresión correlaciona con el grado de agresividad del cáncer y aunque en condiciones normales, GRP78 se encuentra localizada en el lumen de RE, debido a la sobreexpresión en muchos tipos tumorales podemos detectar su expresión en la superficie celular (Arap et al. 2004). Lo que hace de GRP78 un posible biomarcador de la agresividad de cáncer que también correlaciona con su pronóstico y la respuesta a terapias (Lee 2007).

La contribución al desarrollo tumoral de la ruta de **PERK** es más complejo ya que puede promover la supervivencia o la apoptosis en función del contexto. La señalización de PERK podría estar implicada en la resistencia a agentes quimioterapéuticos debido probablemente a la inducción de genes implicados en la resistencia al estrés oxidativo y la inhibición de apoptosis. De hecho, la deficiencia de PERK, retrasa el crecimiento tumoral y reduce la incidencia de metástasis pulmonares y en modelos de ratón de cáncer de mama mientras que la inactivación prolongada de PERK incrementa la susceptibilidad a tumores de mama espontáneos debido a un incremento de la inestabilidad genómica (Bobrovnikova-Marjon et al. 2010). La activación de PERK también promueve la transformación celular inducida por Myc a través de la autofagia, lo que se encuentra relacionado con la fosforilación mediada por PERK de eIF2 α y la consiguiente inducción de los factores de transcripción CHOP y ATF4 que activan la transcripción de muchos genes de autofagia (Hart et al. 2012; B'chir et al. 2013). En contraposición, se ha descrito que la inducción de CHOP en respuesta a un estrés en el RE prolongado provoca la muerte de células pre-maligna previniendo la progresión tumoral. Así, la eliminación de CHOP incrementa la incidencia tumoral de ratones Kras^{G12V} (modelo de inducción de tumores de pulmón) (Huber et al. 2013) y la eliminación específica de CHOP en hepatocitos también incrementa la tumorigénesis en un modelo de ratón de hepatocarcinoma (Nakagawa et al. 2014).

En cuanto a la ruta de IRE-1 α -XBP1, existen numerosas evidencias en diferentes modelos experimentales que indican que la expresión de estos factores es necesaria para el mantenimiento del crecimiento tumoral (Clarke et al. 2014). La expresión de XBP1 es un factor de supervivencia esencial y recientemente se ha establecido una relación entre éste y el factor inducible por hipoxia, HIF, en el que ambos factores establecen una sinergia, para mantener la supervivencia y la tumorigénesis de tumores de mama triple negativos (Chen et al. 2014; Pereira et al. 2014).

6.3.2. UPR en la metástasis y la invasión celular.

Las rutas celulares y moleculares implicadas en la metástasis han sido estudiadas en diversos modelos (Talmadge & Fidler 2010), sin embargo, aunque la relación entre el estrés en el RE y la metástasis es aún un campo por descubrir, diversas evidencias apoyan el papel de la UPR en la regulación de la dinámica del citoesqueleto, la migración celular y la metástasis.

Se ha descrito que la inducción de ATF4 por estrés modula en diversas líneas celulares la expresión del gen asociado a la metástasis LAMP3 y en concreto en células de cáncer de mama, la ruta de señalización PERK/ATF4/LAMP-3 incrementa la migración celular y la invasión en condiciones de hipoxia (Mujcic et al. 2013; Nagelkerke et al. 2013). De la misma manera, en muestras humanas de carcinoma escamoso de cuello, se ha asociado la expresión de LAMP3 con el desarrollo de metástasis y la disminución de la supervivencia, aunque en este caso LAMP3 se encontraba localizado fundamentalmente en zonas de normoxia (Nagelkerke et al. 2015).

Además, también se ha observado un incremento en los niveles de ATF4 en células de carcinoma escamosos de esófago, asociado con invasión celular, metástasis y mal pronóstico. Experimentos in vitro con modelos celulares de cáncer demostraron que la sobreexpresión de ATF4 no afectaba a la supervivencia o proliferación celular, sino que incrementaba la capacidad de migración celular, posiblemente a través de la regulación de alguna metaloproteinasas (Zhu et al. 2014). Además, PERK se encuentra selectiva y constitutivamente activado en células durante la EMT, favoreciendo la supervivencia y la migración asociadas a un incremento en el número de metástasis en modelos de cáncer de mama en ratón (Feng et al. 2014).

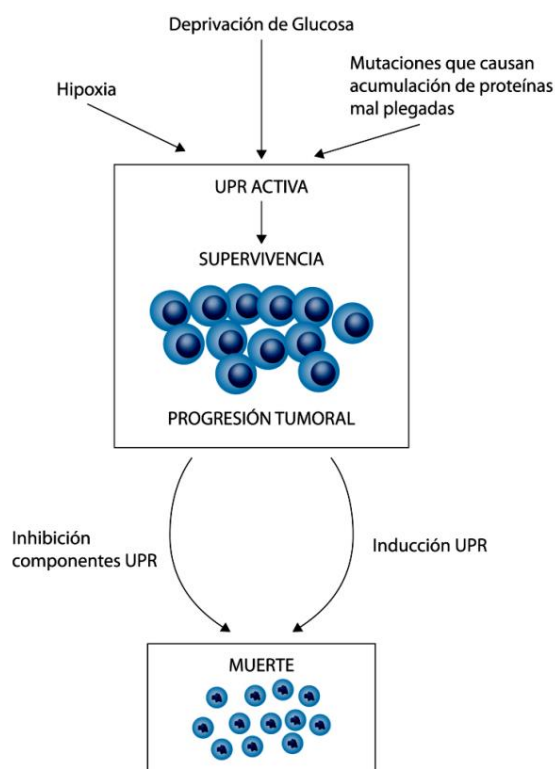
En cuanto a IRE-1 α , parece que su expresión en células normales epiteliales potencia la migración celular in vitro (Simpson et al. 2008), mientras que en células de glioma la señalización de IRE-1 α estaría regulando negativamente la migración y la invasión (Auf et al. 2010). Sin embargo, en tumores de cáncer de mama triple negativos, la inhibición de XBP1 impide la metástasis en pulmón (Chen et al. 2014). Por lo que el papel de IRE-1 α -XBP1 en la migración y en la metástasis despierta todavía ciertas controversias que requieren de un estudio en mayor profundidad.

6.3.3 UPR en la terapia frente al Cáncer.

Una de las principales áreas de desarrollo terapéutico en el campo de la UPR es el cáncer. Estudios iniciales demuestran que la UPR es esencial para la supervivencia y el crecimiento celular en tumores sólidos, actuando como mecanismo de adaptación a las condiciones adversas del microambiente tumoral (Dufey et al. 2014). Sin embargo, si el estrés en el RE perdura o es lo suficientemente pernicioso, la imposibilidad de recuperar la homeostasis promueve la activación de los mecanismos responsables de la inducción de muerte celular

En este sentido, es importante tener en cuenta que las células normales no están a priori sometidas a estrés en el RE por lo que la UPR se encontraría en un estado basal “inactivo”, mientras que las células tumorales, debido tanto a las condiciones del microambiente tumoral como a la alta tasa de proliferación, normalmente presentan una UPR activa, necesaria para la supervivencia celular y que del mismo modo, sugiere la posibilidad de una mayor susceptibilidad a tratamientos exógenos que incrementarían los niveles de estrés y con ello la respuesta apoptótica de la célula.

De este modo, debido a que la activación de la UPR presenta efectos tanto de supervivencia como de muerte celular, el diseño de las estrategias terapéuticas así como la interpretación de los resultados debe hacerse con cautela. Se plantean entonces dos estrategias de tratamiento (**Figura 32**):



- **Inhibición de la UPR:** El tumor requiere una señalización óptima de la UPR, por lo que la reducción en esta señalización compromete la supervivencia de la célula tumoral.

- **Activación de la UPR:** La inducción de estrés en el RE y la sobre-activación de la UPR, provocaría una sobrecarga del mismo y un balance de la señalización hacia la muerte celular.

Figura 32: Estrés en el RE como diana antitumoral. Adaptado de “Targeting the endoplasmic reticulum stress response as an anticancer strategy” (Healy et al. 2009).

Objetivos

OBJETIVOS

En organismos pluricelulares la señalización de apoptosis ha evolucionado para responder a diferentes situaciones de estrés y, en la mayoría de estos casos, la mitocondria desempeña un papel crucial como generador de mensajeros proapoptóticos. Los metazoos superiores han adquirido un mecanismo adicional de señalización de apoptosis mediante la activación de los denominados receptores de muerte celular, con homología estructural al receptor tipo I de TNF-alfa, que se caracterizan por tener un dominio citoplásmico llamado dominio de muerte (DD) que controla la activación de la maquinaria de apoptosis mediante interacciones proteína-proteína. La identificación de nuevos miembros de esta familia, entre los que se encuentra TRAIL/APO-2L, con demostrada especificidad de acción apoptótica sobre células tumorales, generó importantes expectativas como terapia antitumoral.

TRAIL es una proteína transmembrana que activa señales de apoptosis a través de receptores específicos TRAIL-R1 y TRAIL-R2 en la membrana celular en un complejo inductor de muerte (DISC), que contiene la proteína adaptadora FADD y la procaspasa-8. Esta se activa en el DISC y puede activar caspasas efectoras. El grado de activación de caspasa-8 en el DISC de TRAIL depende, entre otros factores, de los niveles celulares de las proteínas inhibidoras FLIP (FLICE_like inhibitory protein), con homología estructural a la caspasa-8 pero carentes de actividad proteasa. La activación de los receptores proapoptóticos de TRAIL mediante TRAIL recombinante o con anticuerpos agonistas de estos receptores está actualmente siendo evaluada en diversos ensayos clínicos como una herramienta antitumoral. Sin embargo, son muchas las incógnitas por resolver relativas a la resistencia de células no tumorales y a la posible resistencia de tumores primarios a estos tratamientos. Por esta razón, el objetivo global del proyecto es entender los mecanismos que controlan la diferente sensibilidad de células normales y tumorales de mama al ligando de muerte celular TRAIL.

Así, los objetivos concretos planteados en esta Tesis Doctoral han sido los siguientes:

1. Determinar el papel de las rutas de señalización MAPK/Erk y PI3K/Akt en la señalización de apoptosis por el ligando TRAIL.
2. Investigar la regulación por el oncogén ErbB2/Her2 de la activación de apoptosis por TRAIL.
3. Estudiar la función reguladora del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento transformante (TGF- β) en la señalización de apoptosis por TRAIL.
4. Analizar el papel del sistema TRAIL en el destino celular tras estrés en el retículo endoplásmico.

Materiales y métodos

1. MATERIALES

1.1. Cultivos celulares

Línea celular	Tipo celular	Medio de cultivo	Procedencia
BT20	Epitelial/ Cáncer de mama	DMEM-F12 completo	ATCC
BT549	Mesenquimal/ Cáncer de mama	DMEM completo + 20mM glucosa	ATCC
HCT-116	Epitelial/ Hepatocarcinoma	McCoy's 5A completo	Dr. José Antonio Pintor (CSIC-CABIMER, Sevilla)
HEK-293T	Embrionarias/ Riñón	DMEM completo	Dr. Antonio Rodríguez (CNIC, Madrid)
HeLa	Epitelial/ Cáncer de cérvix	RPMI 1640 completo	ATCC
HMEC-hTERT	Epitelial/ Mama	DMEM-F12 completo + 10µg/ml de insulina, 10ng/ml EGF y 500ng/ml de hidrocortisona	Dr. Alain Puisieux (CRCL-Inserm, Lyon) (Morel et al. 2012)
HMEC-hTERT-RAS	Epitelial/ Mama	Mismo medio que HMEC-hTERT	Dr. Alain Puisieux (CRCL-Inserm, Lyon) (Morel et al. 2012)
HMEC-hTERT-RAS-ZEB1	Mesenquimal/ Mama	Mismo medio que HMEC-hTERT	Dr. Alain Puisieux (CRCL-Inserm, Lyon) (Morel et al. 2012)
HMEC-hTERT-RAS-ZEB2	Mesenquimal/ Mama	Mismo medio que HMEC-hTERT	Dr. Alain Puisieux (CRCL-Inserm, Lyon) (Morel et al. 2012)
HMEC-hTERT-RAS-TWIST1e12	Mesenquimal/ Mama	Mismo medio que HMEC-hTERT	Dr. Alain Puisieux (CRCL-Inserm, Lyon) (Morel et al. 2012)
HMEC-hTERT-RAS-shp53 EPI	Epitelial/ Mama	Mismo medio que HMEC-hTERT	Dr. Alain Puisieux (CRCL-Inserm, Lyon) (Morel et al. 2012)

Línea celular	Tipo celular	Medio de cultivo	Procedencia
HMEC-hTERT-RAS-shp53 MES	Mesenquimal/ Mama	Mismo medio que HMEC-hTERT	Dr. Alain Puisieux (CRCL-Inserm, Lyon) (Morel et al. 2012) (CRCL-Inserm, Lyon)
MCF10A	Epitelial/ Mama	DMEM-F12 + 5% de HS, 10µg/ml de insulina, 20ng/ml EGF, 10ng/ml de toxina colérica, 500ng/ml de hidrocortisona, 2mM de L-glutamina, 100µg/ml de estreptomycin y 500 U de penicilina.	Dr. Mauricio Reginato (Drexel University, Filadelfia)
MCF10A-pBabe	Epitelial/ Mama *	Mismo medio que MCF10A	Producidas en el laboratorio (Martín-Pérez et al. 2014)
MCF10A-pNeuN	Epitelial/ Mama *	Mismo medio que MCF10A	Producidas en el laboratorio (Martín-Pérez et al. 2014)
MCF10A-pNeuT	Mesenquimal/ Mama *	Mismo medio que MCF10A	Producidas en el laboratorio (Martín-Pérez et al. 2014)
MCF10A-mock	Epitelial/ Mama *	Mismo medio que MCF10A	Producidas en el laboratorio
MCF10A-ERBB2 wt	Epitelial/ Mama *	Mismo medio que MCF10A	Producidas en el laboratorio
MCF10A-ERBB2 p95	Epitelial/ Mama *	Mismo medio que MCF10A	Producidas en el laboratorio
MCF12A	Epitelial/ Mama	DMEM-F12 + 5% de HS, 10µg/ml de insulina, 20ng/ml EGF, 10ng/ml de toxina colérica, 500ng/ml de hidrocortisona, 2mM de L-glutamina, 100µg/ml de estreptomycin y 500 U de penicilina.	Dr. Gemma Fuster (Idibaps, Barcelona) (Yerbes et al. 2012)(Yerbes et al. 2012)
MDA-MB231	Mesenquimal/ Cáncer de mama	RPMI 1640 completo	Dr. Joaquín Arribas (Vall d'Hebron, Bcn)

Línea celular	Tipo celular	Medio de cultivo	Procedencia
MDA-MB231-shSCR	Mesenquimal/ Cáncer de mama*	RPMI 1640 completo	Producidas en el laboratorio
MDA-MB231-shCaspasa 8	Mesenquimal/ Cáncer de mama*	RPMI 1640 completo	Producidas en el laboratorio
MDA-MB231-shTRAIL-R2/DR5	Mesenquimal/ Cáncer de mama*	RPMI 1640 completo	Producidas en el laboratorio
MDA-MB231-pBabe	Mesenquimal/ Cáncer de mama*	RPMI 1640 completo	Producidas en el laboratorio
MDA-MB231-Bcl-XL	Mesenquimal/ Cáncer de mama*	RPMI 1640 completo	Producidas en el laboratorio
MDA-MB436	Mesenquimal/ Cáncer de mama	DMEM-F12 completo	ATCC
MDA-MB468	Epitelial/ Cáncer de mama	DMEM completo	ATCC
NMuMG (ratón)	Epitelial/ Mama	DMEM completo + 10µg/ml de insulina	Dr. José Antonio Pintor (CSIC-CABIMER, Sevilla)
T47D	Epitelial/ Cáncer de mama	RPMI 1640 completo + 20mM glucosa	ATCC

Abreviaturas:

ATCC: American Type Culture Collection; **completo:** 10% de suero fetal bovino (FBS), 2mM de L-glutamina, 100µg/ml de estreptomicina y 500 U de penicilina; **EGF:** Factor de crecimiento epidermal; **HS:** Suero de caballo inactivado; *: **Generadas** mediante infecciones lentivirales o retrovirales como se especifica en el apartado correspondiente de métodos.

Todas las células se mantuvieron en un incubador humidificado a 37°C, con una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de aire.

1.2. Reactivos.

- Medios de cultivo y suplementos.

PRODUCTO	CASA COMERCIAL
DMEM	Sigma-Aldrich
DMEM-F12	Sigma-Aldrich

PRODUCTO	CASA COMERCIAL
McCoys 5A	Sigma-Aldrich
RPMI 1640	Sigma-Aldrich
FBS (Suero fetal bovino)	Sigma-Aldrich
HS (Suero de caballo)	Gibco
Insulina humana	Sigma-Aldrich
Hidrocortisona	Sigma-Aldrich
L-glutamina	Sigma-Aldrich
Antibióticos (Penicilina-Estreptomicina)	Sigma-Aldrich
EGF (Factor de crecimiento epidermal)	Peptotech
Toxina colérica	Sigma-Aldrich
Puromicina	Sigma-Aldrich
Glucosa	Merck-Millipore

- Proteínas recombinantes.

Tanto el TRAIL recombinante con cola de histidinas, así como el TRAIL recombinante biotinilado (TRAIL-b), fueron producidos en nuestro laboratorio, como se describe más adelante. El TRAIL-R2/Fc recombinante humano se obtuvo de R&D Systems (Minneapolis, USA).

- Drogas e Inhibidores.

PRODUCTO	CASA COMERCIAL
Acrilamida	Biorad
Agarosa	Sigma-Aldrich
APS	Biorad
Bafilomicina-A	LC-laboratories
Brefeldina	Selleckchem
Bromuro de etidio	Sigma-Aldrich

PRODUCTO	CASA COMERCIAL
BSA (seroalbúmina bovina fracción V)	Applichem Panreac
Cicloheximida	Sigma-Aldrich
Complete protease inhibitor cocktail	Roche
DTT (Ditiotreitol)	Roche
ECL (Chemoluminiscent HRP substrate)	Millipore
Formalina	Sigma-Aldrich
GSK690693	Selleckchem
Ioduro de propidio	Sigma-Aldrich
Lapatinib	Selleckchem
Matrigel	BD transduction
Membranas de transferencia de PVDF	Millipore
Metanol HIPERPUR	Panreac
Polybrene (sequabrene)	Sigma-Aldrich
Prolonggold	Invitrogen
Q-VD-Oph	Apexbio
Rapamicina	LC-laboratories
Ribonucleasa	Sigma-Aldrich
Salubrinal	Selleckchem
Saponina	Sigma-Aldrich
SB431542	Selleckchem
SP600125	Sigma-Aldrich
Streptavidina-Agarosa	Sigma-Aldrich
Tapsigargina	Sigma-Aldrich
TEMED	Sigma-Aldrich
TGFβ1	Peprotech

PRODUCTO	CASA COMERCIAL
Torina 1	Tocris
Transcriptasa reversa - MLV RT	Gibco
Tunicamicina	Sigma-Aldrich
U0126	Selleckchem
Z-VAD-fmk	Bachem

- Kits.

El kit para realizar el fraccionamiento “**subcellular proteome extraction kit**” se obtuvo de Calbiochem (Merck Chemicals, Darmstadt-Germany)

1.3. Anticuerpos.

1.3.1. Anticuerpos primarios.

- Western-blot.

Antígeno	Peso	Origen/Tipo	Dilución	Casa comercial	Referencia
	Molecular (KDa)				
AKT	60	Conejo/PC	1:1000	Cell signaling	9272
AKT-P (Ser345)	60	Conejo/PC	1:1000	Cell signaling	9271S
AKT P-sustratos	-	Conejo/PC	1:1000	Cell signaling	9611S
ATF4	38/55	Conejo/PC	1:1000	Santa Cruz	SC-200
ATG7	78	Conejo/PC	1:1000	Cell signaling	2631
BCL-XL	17	Conejo/PC	1:1000	BD-Pharmigen	556361
BIM	23	Conejo/PC	1:1000	Calbiochem	202000
caspasa 3	32	Ratón/MC	1:1000	BD-Pharmigen	C-31720
Cpp 32					
Caspasa 8-XMS	53/55- 42/44-18	Conejo/PC	1:1000	Donado por Dr. Gerald Cohen	
β-catenina	92	Ratón/MC	1:500	BD-Pharmigen	610154
CHOP	27	Conejo/PC	1:1000	Cell signaling	5554S

Antígeno	Peso		Origen/Tipo	Dilución	Casa comercial	Referencia
	Molecular	(KDa)				
E-Caderina (6714)	135		Ratón/MC	1:200	Santa Cruz	SC-21791
E-caderina (DECMA-1)	135		Rata/MC	1.500	Santa Cruz	SC-59778
ErbB2	185		Ratón/MC	1:1000	BD-Pharmigen	610161
ERBb2/Her2 clone EP1045Y1	185		Conejo/PC	1:20000	Millipore	04-1127
ERBb2/Her2-P (Tyr1248)	185		Conejo/PC	1:10000	Millipore	06-229
ERK 1/2	42/44		Conejo/PC	1:1000	Upstate	P28482
ERK 1/2-P	42/44		Conejo/PC	1:1000	Cell signaling	9101S
FADD	24		Ratón/MC	1:1000	BD-Pharmigen	610399
Fibronectina	240		Ratón/MC	1:5000	BD-Pharmigen	610178
FLIP(NF6)	55		Ratón/MC	1:1000	Enzo-Alexis	ALX-804-428
GAPDH	37		Ratón/MC	1:40000	Santa Cruz	SC-47724
Ire1α	130		Conejo/PC	1:1000	Cell signaling	3294
LC3 I/II	18-16		Ratón/MC	1:500	Nanotools	0231-100
c-Myc (9E10)	62		Ratón/MC	1:5000	Santa Cruz	SC-40
Noxa	11		Ratón/MC	1:1000	Calbiochem	OP180
Ocludina	60		Conejo/PC	1:250	Invitrogen	71-1500
P-ACC (Ser 79)	280		Conejo/PC	1:1000	Cell signaling	3661
P70S6K	70		Conejo/PC	1:1000	Cell signaling	9202S
P-P70S6K (Thr389)	70		Ratón/MC	1:1000	Cell signaling	9206S
Rab7 (D95F2)	23		Conejo/MC	1:1000	Cell signaling	9367
Snail (C15D3)	30		Conejo/MC	1:1000	Cell signaling	3879S
TRAIL-L (C92B9)	28		Conejo/MC	1:1000	Cell signaling	3219
TRAIL-R2/DR5	48		Cabra/PC	1:1000	R&D systems	AF631
Tubulina	50		Ratón/MC	1:10000	Sigma	T5168

Twist 2	20	Conejo/PC	1:500	Abnova	H00117581-DOP1
Zeb-1(H-102)	124	Conejo/PC	1:200	Santa Cruz	SC-25388

Abreviaturas: MC: Monoclonal; PC: Policlonal.

- Inmunofluorescencia/ Citometría de flujo.

-

Antígeno	Aplicación	Origen/Tipo	Dilución	Casa comercial	Referencia
E-CADERINA	IF/CF	Ratón/MC	IF: 1:50	Santa Cruz	SC-21791
E-CADERINA (DECMA-1)	IF/BLOQ	Rata/MC	1:100	Santa Cruz	SC-59778
Endosomal Marker antibody sampler kit (caveolina- 1,clatrina, EEA1, Rab5,Rab7,Rab11)	IF	Conejo/MC	1:100	Cell signaling	12666
GM130	IF	Rata/MC	1:2000	BD-Pharmigen	610822
IgG-PE	CF	Ratón IgG	2,5µl/muestra	BD-Pharmigen	554680
INTEGRINAα6	IF	Rata/MC	0,180555556	Millipore	MAB1378
LAMP1 (H4A3)	IF	Ratón/MC	1:100	ABCAM	ab25630
LC3	IF	Ratón/MC	1:100	Nanotools	0231-100
PDI	IF	Conejo/ PC	1:100	Enzo	ADI-SPA-890-D
RAB11 (D4F5)	IF	Conejo/ MC	1:100	Cell signaling	5589P
RAB7 (D95F2)	IF	Conejo/MC	1:100	Cell signaling	9367
TRAIL-R1/DR4- PE (CD261)	CF	Ratón IgG	2,5ul/muestra	Biolegend	307206
TRAIL-R2/DR5	IF	Cabra/PC	1:100	R&D systems	AF631
TRAIL-R2/DR5- PE (CD262)	CF	Ratón IgG	2,5ul/muestra	Biolegend	307406

Abreviaturas: BLOQ: Bloqueante; CF: Citometría de flujo; IF: Inmunofluorescencia; MC: Monoclonal; PC: Policlonal;

1.3.2. Anticuerpos secundarios.

- Western-blot.

Los anticuerpos secundarios policlonales conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) fueron adquiridos de DAKO.

- Inmunofluorescencia

Verde	Referencia	Concentración final	Dilución intermedia	Especie
α -ratón Alexa 488	Jackson 715-545-150	1:1000	1:10	burro
α -cabra Alexa 488	Jackson 705-545-147	1:1000	1:10	burro
Naranja	Referencia	Concentración final	Dilución intermedia	Especie
α -cabra Cy3	Jackson 705-165-147	1:1000	1:10	burro
α -conejo Cy3	Jackson 711-165-152	1:1000	1:10	burro

1.4. ARN de interferencia (siRNA)

RNA de interferencia (siRNA)	Secuencia 5'-3'
ATF4	GCCUAGGUCUCUUAGAUGA[dt][dt]
ATG7	AAGGAGUCACAGCUCUCCUU[dt][dt]
Bim	GCAACCUUCUGAUGUAAGU[dt][dt]
Caspasa 8	GGAGCUGCUCUCCGAAUU[dt][dt]
CHOP pool (1-2-3-4)	
chop1	AGGGAGAACCAGGAAACGGAA[dt][dt]
chop2	ACGGCUCAAGCAGGAAAUCA[dt][dt]
chop3	AAGGAAGUGUAUCUUCUACA[dt][dt]
chop4	CAGCUUGUAUAUAGAGAUUGU[dt][dt]
c-Myc	CGGUGCAGCCGUUUUCUA[dt][dt]
E-caderina	GGCCUGAAGUGACUCGUAA[dt][dt]
FADD	GAAGACCUGUGUGCAGCAU[dt][dt]
FLIP(L)	CCUAGGAAUCUGCCUGAUA[dt][dt]
IRE1 α	GCGUCUUUUACUACGUAAU[dt][dt]

RNA de interferencia (siRNA)	Secuencia 5'-3'
Noxa	GGUGCACGUUUCAUCAAUU[dt][dt]
Puma	GGAGGGUCCUGUACAAUCU[dt][dt]
siRNA Control (scrambled)	CUUUGGGUGAUCUACGUUA[dt][dt]
SNAIL pool (1-2-3-4)	
snail1	CCGAAUGUCCCUGCUCCACAA[dt][dt]
snail2	CAGCGAGCUGCAGGACUCUAA[dt][dt]
snail3	GAGGUGUGACUAACUAUGCAA[dt][dt]
snail4	ACACUGGUUUUAUUAUUUCAA[dt][dt]
TRAIL-R1/DR4	GGAACUUUCCGGAUGACA[dt][dt]
TRAIL-R2/DR5	GACCCUUGUGCUCGUUGUC[dt][dt]

2. MÉTODOS.

2.1. Cuantificación de apoptosis.

La apoptosis se cuantificó por citometría de flujo mediante la detección de células hipodiploides. Para ello, se sembraron 3×10^5 células por pocillo en placas de 6 pocillos y tras el tratamiento correspondiente, se recogieron con mediante tripsinización. Se fijaron y permeabilizaron con 900 μ l de una solución de etanol frío al 70%, agitando suavemente en el vórtex e incubando 5 minutos en hielo. Después de lavar, se añadieron 250 μ l de PBS1X y 250 μ l de Solución de Extracción de ADN (0,2M Na_2HPO_4 , 0,1M ácido cítrico en PBS; pH 7,8) y se incubaron durante 10 minutos a 37°C. A continuación y, tras lavarlas con PBS1X, las células fijadas se resuspendieron en 250 μ l de Solución PI/RNasa (100 μ g/ml RNasa, 40 μ g/ml de Ioduro de Propidio en PBS) y se incubaron durante 30 minutos a 37°C en oscuridad. Las células apoptóticas hipodiploides se detectaron y cuantificaron en la población del ciclo celular con menor contenido en ADN que las células el pico G1 (SubG1). La citometría de flujo fue realizada en un citómetro FACScalibur, utilizando el programa Cell Quest Pro (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) para el análisis de los datos.

2.2. Cuantificación de células viables: Tinción con Cristal Violeta.

La cuantificación de las células viables se realizó por tinción con cristal violeta (Sigma-Aldrich). Para ello, se sembraron 35.000 células por pocillo en placas de 24 pocillos y tras el tratamiento

correspondiente, se retiró por aspiración el medio de cultivo y se lavaron 2 veces con PBS1X. A continuación, las células que permanecieron adheridas a la placa se tiñeron 250µl de una solución de 0,2% de Cristal Violeta en etanol al 2% durante 20 minutos a temperatura ambiente (es importante añadirlo sobre la pared del pocillo para no despegar las células adheridas). Transcurrido este tiempo se lavaron los pocillos por inmersión con agua hasta que se eliminó todo el excedente de cristal violeta. Se dejó secar completamente la placa boca abajo sobre un papel de filtro. Una vez secos, se solubilizaron las células con una solución de SDS al 1%. La densidad óptica de cada pocillo se midió en el lector de placas Varioskan Flash (Termo Electron corporation) a una longitud de onda de 590nm.

2.3. Medida de la concentración de proteínas.

Con el fin de cuantificar la cantidad de proteínas que se ha obtenido tras recoger las células, se utilizaron los reactivos de BioRad (Hercules, CA, USA): Bio-Rad Dc Protein Assay Reagent A, B y S. Para ello se hizo una curva patrón con BSA desde 1µg/µl hasta 8µg/µl, sobre la cual se extrapolaron los valores obtenidos de las muestras y se obtuvo la concentración de proteína. En primer lugar se añadieron 5µl de muestra (o una cantidad menor, pero siempre completando hasta 5µl con el buffer en que estuviera diluida la muestra), a cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo plano. En el caso del blanco, se añadieron 5µl del tampón. A continuación se añadieron 25µl de la Solución A' (1ml de Solución A + 20µl de solución S). Posteriormente se añadieron 200µl del reactivo B. Se dejó incubando 15 minutos a temperatura ambiente y se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 750 nm en el lector de placas Varioskan Flash (Termo Electron Corporation).

2.4. Inmunodetección de proteínas por western-blot.

Para el análisis de la expresión de proteínas por western-blot, las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos a una densidad de 3×10^5 células por pocillo en medio completo y mantenidas una noche a 37°C en incubador con una atmósfera humidificadas con un 5% de CO₂. Tras el tratamiento, se aspiró el medio de cultivo y la monocapa celular se lavó una vez con PBS 1X frío. Para la obtención de extractos proteicos y según la opción deseada se emplearon dos métodos distintos.

- **Obtención de extractos totales: Buffer de lisis TR3 (10mM Na₂HPO₄, 10% Glicerol, 3% SDS).**

Una vez lavadas y en frío, se añaden entre 30-60 µl de buffer TR3 por cada pocillo de la placa, se lisan las células utilizando un *scraper* que raspará la monocapa y el volumen de lisis de cada pocillo es recogido en *ependorf* para cada condición. Cada muestra es sonicada durante 10 segundos en modo constante y al 10% de amplitud. A continuación, se separan 5 µl de muestra para realizar la

cuantificación proteica y al resto se le añade un 10% de su volumen de una solución de Azul de Bromofenol: β -mercaptoetanol en proporción 1:1 o Azul de Bromofenol: Agua en proporción 1:1 en caso de muestras que no requieran agente reductor. En este momento, la muestra puede ser congelada y mantenida a -20°C .

- **Obtención de extractos solubles: Buffer de lisis RIPA (20mM HEPES, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% NP-40, 0,25% NaDeoxicolato, 0,1% SDS, 10 mM NaF)**

Una vez lavadas y en frío, se añaden entre 30-60 μl de buffer de lisis RIPA (al que previamente hemos añadido inhibidores de proteasas y NaOV_4) por cada pocillo de la placa, utilizando un *scraper* que raspará la monocapa y el volumen de lisis de cada pocillo es recogido en tubo *eppendorf* para cada condición. Se dejan lisando 30 minutos en hielo y posteriormente se centrifugan a 4°C durante 10 minutos a 13.000 rpm. Transcurrido este tiempo, se recoge el sobrenadante y se deposita en un nuevo *eppendorf*. Se separan 5 μl de muestra para realizar la cuantificación proteica y al resto se le añade el volumen correspondiente de tampón de carga Laemli 5X (250mM TrisHCl, 500mMDTT, 10% SDS, 20% Glicerol, 0,2% azul de bromofenol, hasta 10ml de H_2O).

Una vez cuantificada la cantidad de proteína por muestra, las muestras se hirvieron a 95°C durante 5 minutos y las proteínas se separaron mediante electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, a un porcentaje del 7,5%, 10% o 12% dependiendo del peso molecular de la proteína a detectar. Para la preparación del gel se utilizó Lower Buffer (1), Upper Buffer (2), Acrilamida, Agua, APS (ammonium persulfate, Sigma-Aldrich), TEMED (Sigma-Aldrich). La electroforesis se realizó en Running Buffer (3), a un voltaje constante de 140 voltios durante 1 hora aproximadamente. Las proteínas de este gel se transfirieron a una membrana de PVDF (Immobilon, Millipore), previamente tratadas con metanol y mantenidas en tampón de transferencia 1X (100ml de tampón de transferencia 10X (4), 200ml de metanol, hasta 1000ml de H_2O) mediante la técnica de transferencia semiseca con el sistema Trans-Blot turbo (Bio-Rad) a 25 Voltios constantes, 1 Amperio durante 20 minutos.

La membrana se bloqueó con una solución PBS 0'1% Tween 20 (PBS/Tween) con 5% de leche en polvo durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó la membrana con PBS-Tween y se incubó con el anticuerpo correspondiente durante 1 hora a temperatura ambiente, o a 4°C durante toda la noche, en agitación.

Tras la incubación con el anticuerpo, se lavó la membrana 3 veces con PBS-Tween durante cinco minutos cada lavado, y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución PBS-Tween 5% de leche en polvo y el anticuerpo secundario correspondiente, que lleva acoplado la

peroxidasa del rábano picante (HRP). De nuevo se hicieron tres lavados de cinco minutos cada uno con PBS-Tween y se incubó la membrana con el reactivo ECL (Millipore) durante cinco minutos, tras lo cual se reveló mediante quimioluminiscencia.

(1) LOWER BUFFER 4X (pH 8,8)	
Tris-base (Roche)	90,85 g
SDS 10% (Sigma-Aldrich)	20 ml
H ₂ O	Hasta 500ml

**Ajustar pH a 8,8 con HCl*

(3) RUNNING BUFFER 5X (pH 8,3)	
Tris-base (Roche)	15 g
Glicina (Sigma-Aldrich)	72g
SDS (Sigma-Aldrich)	5 g
H ₂ O	Hasta 1000ml

**No ajustar pH. Debe salir aproximadamente 8,3*

(2) UPPER BUFFER 4X (pH 6,8)	
Tris-base (Roche)	6,06 g
SDS 10% (Sigma-Aldrich)	4 ml
H ₂ O	Hasta 100ml

**Ajustar pH a 6,8 con HCl*

(4) Tampón de transferencia 10X (pH 9)	
Tris-base (Roche)	58 g
Glicina (Sigma-Aldrich)	29g
SDS (Sigma-Aldrich)	3,7 g
H ₂ O	Hasta 1000ml

**No ajustar pH. Debe salir aproximadamente 9*

2.5. Producción de TRAIL recombinante y TRAIL biotinilado (TRAIL-b)

El TRAIL recombinante, así como el TRAIL recombinante biotinilado (TRAIL-b), fueron producidos a partir de una construcción amablemente cedida por la Dra. Marion MacFarlane (MCR Toxicology Unit, University of Leicester, UK) que codifica para TRAIL recombinante (aminoácidos 95-281) insertada en BamHI/XhoI del vector pET-28b (+) con resistencia a kanamicina y una cola de seis histidinas para facilitar la purificación de la proteína recombinante (MacFarlane et al., 1997). Brevemente: se transformaron bacterias BL21 con 1-2 µg de ADN por choque térmico y se crecieron en medio LB (Luria-Bertani), con 20mM de glucosa y 30µg/ml de kanamicina. Cuando el precultivo alcanzó la densidad óptica de 0.6-0.8 a la longitud de onda de 600nm se indujo la síntesis de la proteína recombinante añadiendo al cultivo 0.5µM de IPTG (isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido).

Tras tres horas de inducción a temperatura ambiente, las bacterias se recogieron por centrifugación y se lisaron, tras un lavado con PBS 1X, en un tampón de lisis que contiene 30mM de Tris-HCl (pH 7,5), 150mM de NaCl, 10% de glicerol, 1% de Tritón X-100 e inhibidores de proteasas. Este lisado se incubó en un rotor circular durante 16 horas a 4°C, en una columna de sefarosa quelada con Níquel (Quelatin Sepharose Fast Flow; GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suiza), a la que el TRAIL quedará unido por la cola de histidinas. Transcurrido este tiempo, se lava la columna seis veces con PBS frío antes de eluir el TRAIL con una solución 100mM de EDTA en PBS. Las fracciones más

purificadas se titularon en actividad realizando un ensayo de apoptosis en células HeLa, sensibles a TRAIL y se almacenaron a -80°C .

En el caso del TRAIL biotinilado, antes de eluir la proteína de la columna, se incubó con $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ de reactivo de biotinilización (Ácido D-biotil- ϵ -aminocaproico N-Hidroxisuccinimida éster; Roche) durante 1 hora a 4°C , tras lo cual, se eluyó con una solución 150 mM de EDTA en PBS.

2.6. Análisis del DISC de TRAIL.

El aislamiento del DISC de TRAIL fue realizado utilizando TRAIL biotinilado recombinante (TRAIL-b), sintetizado en nuestro laboratorio. Las células, 20×10^6 se incubaron con el tratamiento correspondiente y transcurrido ese tiempo, las células se trataron con 500 ng/ml o $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ de TRAIL-b durante 30-60 minutos. Posteriormente, se lavaron con PBS frío tres veces y se lisaron en 3 ml de tampón de lisis (30 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM de NaCl, 10% de glicerol, 1% de Tritón X-100, 0.1% de deoxicolato, inhibidores de proteasas (Complete Inhibitors de Roche) durante 30 minutos en hielo. El lisado se recogió en tubos eppendorf y centrifugó en una minifuga durante 30 minutos a máxima velocidad. Se recogieron los sobrenadantes, guardando $50\text{ }\mu\text{l}$ como control interno (Input). El DISC de TRAIL fue aislado de la misma cantidad de proteína en cada caso utilizando $30\text{ }\mu\text{l}$ de Streptavidina-agarosa (Sigma), tras incubación toda la noche a 4°C con agitación en un rotor circular. Los complejos se lavaron 6 veces con $500\text{ }\mu\text{l}$ de tampón de lisis y posteriormente se añadió $30\text{ }\mu\text{l}$ de tampón de carga Laemmli 1X y las muestras se hirvieron a 95°C durante 5 minutos para su análisis proteico por western blot.

2.7. Análisis de E-caderina y de los receptores de TRAIL en la superficie celular.

Para detectar la expresión de los receptores de TRAIL en la superficie celular, las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos a una densidad de 3×10^5 células por pocillo en medio completo y mantenidas una noche overnight a 37°C en una atmósfera humidificadas con un 5% de CO_2 . Al día siguiente y tras recibir el tratamiento oportuno fueron despegadas con tripsina y se recogieron en tubos de 5 ml de citometría de fondo redondo (Falcon) que mantendremos en hielo durante todo el proceso. A continuación las células se lavaron con PBS 1X y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C . Se eliminó el sobrenadante por decantación y el pellet se resuspendió en 1 ml de medio de crecimiento. Para que los receptores y las proteínas de membrana se estabilicen tras la tripsinización, los tubos de citometría con las células se incubaron durante 15 min a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO_2 . Transcurrido este tiempo, las células se centrifugaron de nuevo a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C . Se eliminó el sobrenadante por decantación y el pellet se

resuspendió en 100 μ l de PBS 1X /muestra y se incubó con el anticuerpo correspondiente unido a ficoeritrina (-PE) a una concentración de 5 μ g/ml durante 30 min a 4°C y en oscuridad (se cubrieron los tubos con papel de aluminio). Transcurrido ese tiempo, se añaden 4 ml de PBS 1X por tubo y se lava centrifugando a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C para eliminar el exceso de anticuerpo primario. Se eliminó el sobrenadante por decantación y se resuspendió el pellet con 250 μ l de PBS 1X/ tubo. La detección de los receptores de muerte se realizó con un citómetro de flujo FACScalibur, utilizando el programa Cell Quest Pro (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) para el análisis de los datos.

En el caso de que el anticuerpo primario no se encontrara conjugado con -PE, después de lavar con PBS el anticuerpo primario, las células se incubaron con un anticuerpo secundario anti-inmunoglobulinas de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) en una dilución 1:20 durante 30 minutos a 4°C en oscuridad, se volvieron a lavar con PBS 1X y se resuspendieron en 250 μ l de PBS 1X/ tubo para la detección por citometría de flujo.

2.8. Análisis de la internalización de los receptores de TRAIL mediada por ligando.

Para analizar la internalización de los receptores de TRAIL, sembramos 3 x 10⁵ células por pocillo en placas de 6 pocillos. Se trataron las células con 500ng/ml de TRAIL y se incubaron durante 0, 5, 10, 15, 30 minutos a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂, periodo en el cual los receptores de TRAIL se van a internalizar.

El proceso de internalización se detuvo poniendo la placa de células en hielo y lavando 2 veces durante 5 minutos en agitación con PBS 1X a 4°C. A continuación se procedió a eliminar el ligando de la superficie que no se ha internalizado con lavando a 4°C, 3 veces durante 5 minutos en agitación con buffer ácido (DMEM-F12, 0.2%BSA, pH 3,5 ajustado con HCl) y tras esto lavaremos con PBS 1X otras 3 veces durante 5 minutos a 4°C y en agitación. Realizado este proceso, se detectaron los receptores de TRAIL en la superficie celular tal y como se especifica en el apartado 2.7.

2.9. Fraccionamiento celular.

Para el análisis de la localización subcelular de las proteínas del DISC, se realizó un fraccionamiento celular que se desarrolló utilizando el sistema de ProteoExtractTM (*subcelular proteome Extraction KIT*, Calbiochem) siguiendo las recomendaciones del fabricante, que nos permitió separar las fracciones de citosol, membrana y citoesqueleto. Una vez separadas las fracciones, el análisis de la expresión de proteínas se realizó mediante western-blot.

2.10. Transfección transitoria con oligos de RNA de interferencia (siRNA)

El silenciamiento transitorio de proteínas celulares mediante siRNA se llevó a cabo con el reactivo de transfección Dharmafect-1 (Dharmacon). Para ello se sembraron 250.000 células por pocillo en placas de cultivo de 6 pocillos, en medio completo sin antibiótico. Al día siguiente, el medio completo fue sustituido por 2 ml de medio de transfección durante 6 horas, tras las cuales este medio es aspirado y sustituido por medio de crecimiento completo que mantendremos durante 24 horas más.

El medio de transfección se compone de 50-100nM de oligos de siRNA, 2'5 µl de Dharmafect y 2ml de medio Optimen (Gibco-Invitrogen). La preparación del medio de transfección consta de dos pasos. En primer lugar se mezclan durante 5 minutos a temperatura ambiente el Dharmafect con el medio Optimen. Pasado este tiempo, se añade esta mezcla a los oligos y se incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente. En ese tiempo, se lavan los pocillos con medio Optimen y se les añade 1'6 ml del mismo a cada pocillo. Tras los 20 minutos de incubación, se añaden 400 µl de la mezcla Optimen/Dharmafect/oligos, al pocillo correspondiente.

2.11. Producción Viral.

Para la producción de retrovirus y lentivirus, se utilizó la línea celular HEK293T (amablemente cedida por el Dr. Antonio Rodríguez Márquez, CNIC, Madrid) y los siguientes plásmidos:

Plásmidos retrovirales:

El plásmido **pCI-VSV-G**, que codifica para la expresión del gen de la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), comúnmente utilizada para el pseudotipaje de lentivirus y retrovirus y el plásmido **pVpack-GP-dl**, que codifica para la expresión de los genes virales gag, pol, fueron amablemente cedidos por el Dr. Antonio Rodríguez. Los plásmidos **pBabe-Puro** y **pBabe-NeuN**, **pBabe-NeuT** fueron amablemente cedidos por el Dr. Mauricio Reginato (Drexel University, Filadelfia), el plásmido **pBabe-Bcl-XL** fue una donación de la Dra. Cristina Muñoz-Pinedo (IDIBELL, Barcelona) y los plásmidos **pBabe-wtHer2** y **pbabe-p95Her2** fueron igualmente una donación del Dr. Joaquín Arribas (Hospital Vall d'Hebron, Barcelona).

Plásmidos lentivirales:

El plásmido **pMD2.G**, que codifica para la expresión del gen de la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) comúnmente utilizada para el pseudotipaje de lentivirus y retrovirus, el plásmido **psPAX2**, que codifica para la expresión de los genes virales gag, pol y rev y el plásmido

pLVTHM que codifica para la expresión del shRNA de interés y que sirvió de base para la construcción de los plásmidos **pLVTHM-sh Caspasa 8**, **pLVTHM-shTRAIL-R2/DR5** y **pLVTHM-sh Scrambled**, fueron amablemente cedidos por la Dra. Rosa M^a Ríos (CABIMER, Sevilla).

Para la construcción de los plásmidos **pLVTHM-sh Caspasa 8**, **pLVTHM-shTRAIL-R2/DR5** y **pLVTHM-sh Scrambled (Control)** se siguió la siguiente estrategia.

En primer lugar se diseñan los DNA hairpins FW/RW de 60 NT que codifican las secuencias de siRNA de acuerdo con la siguiente estructura:

5'-BglII --|----secuencia directa 5'3'----|---Hairpin---|----secuencia indirecta 5'3'----| -- HindIII-3'

Sh-Scrambled:

5' -GATCCCC- TATAGTCCGCGTTTTGTGA -TTCAAGAGA- ATATCAGGCGCAAAACACT -TTTTTA-3'
5' -AGCTTAAAAA- TATAGTCCGCGTTTTGTGA -TCTCTTGAA- ATATCAGGCGCAAAACACT -GGG-3'

sh-Caspasa8

5' -GATCCCC- GGAGCTGCTCTTCCGAATT -TTCAAGAGA- AATTCGGAAGAGCAGCTCC -TTTTTA-3'
5' -AGCTTAAAAA- GGAGCTGCTCTTCCGAATT -TCTCTTGAA- AATTCGGAAGAGCAGCTCC -GGG-3'

shTRAIL-R2/DR5

5' -GATCCCC- GACCCTTGTGCTCGTTGTC -TTCAAGAGA- GACAACGAGCACAAGGGTC -TTTTTA-3'
5' -AGCTTAAAAA- GACCCTTGTGCTCGTTGTC -TCTCTTGAA- GACAACGAGCACAAGGGTC -GGG-3'

Las secuencias de ADN correspondiente al shRNA de Caspasa 8 y de TRAIL-R2/DR5 y del shRNA-Scrambled se clonaron en las dianas de restricción para BglII y HindIII del vector **pSUPER.RETRO**. Posteriormente la secuencia de ADN codificante para el promotor HI (incluida en el vector pSUPER-RETRO) unida a la secuencia de los shRNA fue subclonada en el plásmido **pLVTHM** utilizando las dianas de restricción para EcoRI/CLA1 del plásmido pLVTHM.

La producción de retrovirus y lentivirus se realizó mediante la transfección, con los plásmidos correspondientes, de las células HEK293T por el método del fosfato cálcico (Ausubel, F.M. et al. 1994) basado en la obtención de un precipitado de fosfato cálcico y ADN en una solución salina de fosfatos. El precipitado forma agregados que pueden ser endocitados/fagocitados por las células.

Brevemente: se sembraron 2×10^6 células HEK293T en placas de 90 mm en 10 ml de medio completo, para que al día siguiente, al transfectar, tengan una confluencia de un 80%. 3 horas antes de la transfección se substituyó el medio de cultivo por 8 ml de medio fresco. Las células se transfectaron con 27 μg de ADN total en una proporción 1:2:3 de plásmido pMD2.G (4'5 μg), plásmido psPAX2 (9 μg) y plásmido de interés pLVTHM-sh correspondiente (13'5 μg), en el caso de lentivirus, y 4'5 μg de plásmido pCI-VSV-G, 9 μg de plásmido pVpack-GP-dl y 13'5 μg de plásmido pBabe-de interés según corresponda, en el caso de retrovirus. El ADN de los tres plásmidos se mezcla suavemente y se añade gota a gota a un tubo con 0'5 ml de HBS 2X. Tras mezclar suavemente, se añaden, despacio y gota a gota, 30 μl de CaCl_2 2'5M y se agita inmediatamente. Se deja incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos y se añaden gota a gota 0'5 ml de la mezcla a cada placa de células. Las células se dejan en un incubador a 37°C y 5% de CO_2 durante toda la noche. Tras este tiempo se retira el medio de transfección y se añaden 8 ml de medio fresco, incubándose bajo las mismas condiciones durante 48 horas más, en el caso de lentivirus y 72 horas en el caso de retrovirus. Transcurrido este tiempo, se recoge el medio celular, se centrifuga 5 minutos a 3000 rpm para eliminar los restos celulares y se limpia pasándolo a través de filtros de 0'45 μm . Una vez filtrado, los virus presentes en el medio celular se concentran mediante centrifugación en filtros Vivaspín 20 Polyethersulfone 100.000 MWCO (Sartorius Gropu-DICSA), a una velocidad de 1.800 x g y a una temperatura de 4°C. Tras la concentración, los virus concentrados pueden almacenarse a -80°C.

Para conocer el título viral, se sembraron 80.000 células en pocillos de placas de 6 pocillos. A la mañana siguiente, se añadieron a cada pocillo cantidades crecientes de virus. Se completó hasta 1ml con medio fresco y se añadió Polybrene a la concentración de 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Tras 48 horas, se midió el porcentaje de células positivas para GFP mediante citometría de flujo y se obtuvo una curva de infección, mediante la cual podemos conocer la cantidad de virus obtenida y el volumen de virus necesarios para infectar a un determinado número de células.

En el caso de la producción de retrovirus, tras eliminar los restos celulares y purificar el medio celular con los filtros de 0.45 μm , se alícuota el sobrenadante y se mantiene a -80°C.

HBS2X (pH 7,5)	
NaCl (Sigma-Aldrich #S9625)	280 mM
Hepes	100 mM
Na_2HPO_4 (Sigma-Aldrich #S9638)	1,5 mM

**Ajustar pH a 7,5 con HCl*

2.12. Infección viral.

- Infección retroviral:

Para la obtención de células **MDA-MB231** que sobreexpresan **Bcl-XL** y células **MCF10A** que sobreexpresan el gen **ErBB2-Neu**, **ErBB2-NeuT**, el gen **wtHER2** o el gen **p95HER2/611CTF** se cultivaron 5×10^5 células en una placa de 90 mm. Al día siguiente se infectaron con una mezcla de 2 ml de sobrenadante viral (obtenido como se comenta anteriormente en el apartado producción viral), 2 ml de medio fresco y Polybrene (Sigma-Aldrich) a una concentración de 8 $\mu\text{g/ml}$. A las 6 horas de la infección se le añadieron 6ml de medio fresco y se dejaron otras 15-16 horas. Pasado este tiempo, se retiró el medio de infección y se añadió medio fresco nuevo. Tras 48 horas, se añadió el antibiótico de selección Puomicina a una concentración de 1'5 $\mu\text{g/ml}$ y se seleccionaron durante otras 48 horas.

- Infección lentiviral:

Para la obtención de células **MDA-MB231** que expresan el **shRNA-Caspasa 8**, el **shRNA TRAIL-R2/DR5** o el **shRNA-Scrambled** y células **MCF10A** que expresan el **shRNA-Caspasa 8** o el **shRNA scrambled** se cultivaron 5×10^5 células en una placa de 90 mm. Al día siguiente se infectaron con una mezcla de 2 ml de sobrenadante viral (obtenido como se comenta anteriormente en el apartado producción viral), 2 ml de medio fresco y Polybrene (Sigma-Aldrich) a una concentración de 8 $\mu\text{g/ml}$. A las 6 horas de la infección se le añadieron 6ml de medio fresco y se incubaron otras 15-16 horas. Pasado este tiempo, se retiró el medio de infección y se añadió medio fresco nuevo. La detección del % de células positivas para la expresión de los lentivirus que expresan GFP se realizó mediante citometría de flujo en un citómetro FACScalibur, utilizando el programa Cell Quest Pro (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) para el análisis de los datos.

2.13. RT-PCR (Transcripción reversa de ARN y amplificación de ADN por reacción en cadena de la polimerasa).

- Extracción de RNA

El RNA total de las células se obtuvo utilizando el sistema de extracción de RNA RiboZol (Amresco, VWR), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente: Se aspiró el medio de cultivo de las placas que contenían las células adherentes, se añadió 1 ml de RiboZol por pocillo de placa de 6 pocillos y se recogió en tubos *eppendorf* para cada condición. Se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente, tras los cuales se añadieron 200 μl de Cloroformo (Cl_3CH), los tubos se agitaron vigorosamente durante 15 segundos y se dejaron reposar durante 3 minutos a temperatura

ambiente. Se centrifugaron a 13.000 rpm durante 15 minutos a 4°C y se recogió la fase acuosa (superior) en otro tubo *eppendorf*. Al volumen correspondiente de la fase acuosa recogida se le añadieron 500 µl de isopropanol que se mezclaron despacio hasta obtener una mezcla homogénea. Se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante por decantación y el pellet de RNA fue lavado con 1 ml de etanol al 75%, se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante con una punta amarilla y con cuidado de no aspirar el pellet de RNA. Se secó el pellet de RNA en una estufa a 37°C durante aproximadamente 20 minutos y cuando estuvieron completamente secos se resuspendieron en 12 µl de H₂O-DEPC incubando 10 minutos a 55-60°C.

- RT-PCR

Partiendo de 2 µg de RNA total y utilizando un kit de transcriptasa reversa M-MLV (Gibco) se sintetizó el DNA complementario (cDNA). De este DNA se tomó 1 µl para su amplificación por PCR. Los cebadores utilizados para la amplificación de mRNAs se obtuvieron de Sigma.

Cebador	Secuencia 5'-3'
XBP1- forward	TTACGGGAGAAAACCTCACGGC
XBP1-reverse	GGGTCCAACCTGTCCAGAATGC
Actina-forward	TGACGGGGTCAACCCACACTGTGCCCATCTA
Actina-reverse	CATGAAGCATTTGCGGTGGACGATGGAGGG

El programa para **amplificar actina** (661 pb) se describe la siguiente tabla.

Pasos de la PCR	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	2 minutos	1x
Desnaturalización	94 °C	40 segundos	27 x
Anillamiento	60 °C	40 segundos	
Elongación	72 °C	40 segundos	
Elongación final	72 °C	10 minutos	1x

Los productos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa (Applichem) al 1% en tampón TAE 1X con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich).

El programa usado para **amplificar XBP1** (se amplifican ambos productos, no procesado: 283 pb y procesado: 257 pb) se describe en la siguiente tabla.

Pasos de la PCR	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	5 minutos	1x
Desnaturalización	95 °C	60 segundos	35 x
Anillamiento	58 °C	30 segundos	
Elongación	72 °C	30 segundos	
Elongación final	72 °C	5 minutos	1x

Los productos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa (Applichem) al 3% en tampón TAE 1X con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich). La cuantificación de los productos se realizó mediante software Imege-Quant 5.2 (Amersham-Biosciences)

TAE (1X)	VOLUMEN
TrisBase	4,84 g
EDTA 0,5M pH 8	2 ml
Ácido acético glacial	1,1 ml
H ₂ O hasta 1L	

2.14. RT-Q-PCR.

La PCR cuantitativa se empleó para el análisis de la expresión de RNA mensajero. Se realizó utilizando el Taqman Universal PCR Master MIX según las instrucciones del fabricante y con el sistema 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Las sondas comerciales Taqman frente al cDNA humano utilizadas fueron las siguientes:

Sonda Taqman	Referencia
ATF6	(ATF6 Hs00232586_m1)
CHOP	(CHOP Hs01090850_m1)

c-MYC	(c-MYC Hs00905030_m1)
FLIP (L)	(FLIP (L) AIN1EV0)
HPRT1 (control interno)	(HPRT1 Hs01003267_m1)
PUMA	(PUMA Hs00248075_m1)
TRAIL	(TRAIL Hs00921974_m1)
TRAIL-R2	(TRAIL-R2 Hs00366278_m1)

2.15. RT-MLPA (*Retrotranscriptase Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification*).

El análisis de los diferentes RNAs mensajeros de proteínas relacionadas con apoptosis se realizó mediante la técnica de RT_MLPA por el grupo del Dr. Joan Gil de la Universidad de Barcelona.

El RT-MLPA es una adaptación de la tecnología del MLPA (Schouten et al. 2002) para analizar el número de copias de múltiples secuencias de mRNA en un solo tubo de reacción (Eldering et al. 2003) y se aplica para analizar el perfil de expresión de RNAm de las condiciones de interés. El *kit* utilizado fue el SALSA RT-MLPA KIT R011 Apoptosis mRNA (MRC-Holland), que nos permite analizar el perfil de expresión de 37 genes, 32 de los cuales están relacionados con la apoptosis. Las secuencias de mRNA a analizar se retrotranscriben a cDNA con *primers* específicos para cada secuencia. Como en el MS-MLPA, el método se basa en que cada gen a analizar tiene diseñado un par de sondas complementarias a la cadena de cDNA, una consecutiva a la otra. Además, una de las sondas tiene una cola de nucleótidos de tamaño variable para cada uno de los genes. Así pues, las sondas se hibridan al cDNA de modo que cuantas más copias de un cDNA exista, más sondas habrán hibridado con ellas. A continuación, se realiza una reacción de ligación de las 2 sondas hibridadas sólo en el caso de que se hubieran hibridado con el cDNA, es decir, de forma adyacente, y no en el caso de hibridación con ADN genómico. Las sondas están dirigidas contra regiones exónicas y su diseño está realizado y optimizado por la casa comercial. En los extremos de todas las sondas se ha añadido un par de secuencias idénticas, que permite realizar una PCR con un solo par de *primers* para todos los productos de la ligación. Los *primers* están marcados con FAM. Así pues, el producto final de PCR son varias secuencias de nucleótidos de tamaño diferente según el gen a analizar. Mediante una electroforesis capilar se separan los productos por tamaño y se determina el área de fluorescencia (FAM) que permite cada producto cuyo tamaño será directamente proporcional a la cantidad inicial

de RNAm del gen de interés. Entre los genes analizados se encuentran 5 genes potencialmente normalizadores. Los datos obtenidos se normalizan con el control adecuado en cada tipo celular, para compensar errores en la carga inicial de RNAm. La comparación de dos muestras normalizadas por uno de los genes que existe en el *kit*, nos permite analizar si de un gen se ha inhibido o activado su transcripción después de un tratamiento. En el momento en que se realizaron los experimentos incluidos en esta tesis, MRC-Holland comercializaba el *kit* SALSA RT-MLPA KIT R011 Apoptosis mRNA. Posteriormente, la casa comercial ha emitido nuevas versiones del *kit* en las que se han reemplazado algunas sondas y se han incluido algunas nuevas. En el RTMLPA los datos obtenidos pueden representarse de diferentes maneras para destacar diferentes aspectos de los resultados. Representando directamente los valores de los picos de la electroforesis, “expresión relativa”, nos da una idea de la cantidad de RNAm de cada gen. Sin embargo, en el *kit* se han añadido inhibidores competitivos de la PCR para algunos genes muy expresados en la célula, en concreto *BCL-X*, *BRUCE*, *BNIP3L* y *MCL-1*, con el objetivo de disminuir la cantidad de producto final de modo que todos los productos de PCR estén en un mismo rango en la lectura de la electroforesis (*FTL*, *B2M* y *SERPIN*).

Tras normalizar los datos con el gen normalizador adecuado, obtenemos valores que indican si un gen ha inhibido o activado su transcripción después de un tratamiento. Estos valores pueden referirse al control, de modo que se obtenga la “expresión relativa al control” o “veces de inducción”. En esta representación se destacan las inducciones de expresión de cada gen. *Protocolo*: 200 ng de ARN total fueron retrotranscritos usando primers específicos para los genes de interés y el enzima M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI). El cDNA fue incubado durante 16 horas con las sondas del *kit* a 60°C. Los oligonucleótidos fueron ligados añadiendo la Ligase-65 (MRC-Holland, Ámsterdam) durante 15 minutos a 54°C. Los productos de la ligación fueron amplificados por PCR (35 ciclos, 30 segundos a 95°C; 30 segundos a 60°C, y 1 minuto a 72°C). Los fragmentos amplificados, producto de la PCR, fueron separados por electroforesis capilar en un ABI-Prism 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems/Hitachi, Foster City, CA). El área de cada uno de los picos fue analizado usando el programa GeneMapper® de 48 capilares (Applied Biosystems). Las áreas de pico fueron exportadas a un archivo Microsoft Excel®. Los niveles de cada uno de los RNAm fueron normalizados por el gen *β -glucuronidasa* (*GUSB*).

2.16. Inmunofluorescencia.

Para el análisis de expresión de proteínas por microscopía de fluorescencia o microscopía confocal, las células fueron sembradas en cubre-objetos a una densidad de 3×10^5 células por pocillo de placa de 6 pocillos en medio completo y mantenidas una noche overnight a 37°C en una atmósfera humidificadas con un 5% de CO₂. Al día siguiente y tras recibir el tratamiento oportuno, los cubre-

objetos fueron lavados con PBS 1X y rápidamente fijados y permeabilizados bien en 100% metanol HIPERPUR (Panreac) a -20°C durante 6 minutos o fijadas en 4% de paraformaldehído (Polyscience, Inc) durante 10 minutos a temperatura ambiente y permeabilizadas con 0,5% de tritón-X100 (Sigma-aldrich).

A continuación y tras ser lavadas 3 veces durante 5 minutos con 0,1% PBS-tween, las células se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente durante 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo las células se lavaron 3 veces durante 5 minutos con 0,1% PBS-tween y se incubaron con el anticuerpo secundario fluorescente apropiado durante 1 hora, tras lo cual de nuevo se realizaron 3 lavados de 5 minutos con 0,1% PBS-tween y se procedió a la tinción de los núcleos con 1µg/ml de DAPI.

- Microscopía fluorescencia y microscopía confocal y análisis de imagen.

Las imágenes de microscopía de fluorescencia fueron tomadas en un microscopio de fluorescencia Leica DFC500 y las imágenes de microscopía confocal fueron tomadas usando un microscopio confocal espectral (Leica TCS-SP5) equipado con microscopio DMI60000. El procesamiento de las imágenes se realizó el software de Leica (LAS) y Adobe Photoshop. Para la presentación, todas las imágenes han sido ajustadas a nivel de intensidad, contraste y/o brillo.

La cuantificación de los niveles de punteado de TRAIL-R2/DR5 o LC3 se contaron como mínimo 100 células/muestra y para ello se empleó el módulo “granularity” de software Metamorph offline.

2.17. Estudios de morfogénesis

2.17.1. Cultivos tridimensionales de células epiteliales.

En primer lugar, se repartieron 50 µl de Matrigel (GFR BD; Ref. 354230) previamente descongelado en hielo, en cada pocillo de la placa (BD Transduction, Ref. 354118). Se dejó la placa en el incubador de células durante 20 minutos para que el Matrigel gelificase y a continuación se añadieron 5.000 células por pocillo resuspendidas en 400 µl de medio de ensayo 3D, al que se suplementó con 5ng/ml de EGF (Peprotech) y 2% de Matrigel. Las células se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante los días deseados para el estudio de formación de acinos.

Cada 4 días el medio era sustituido por otros 400 µl de medio de ensayo 3D, suplementado con 5ng/ml de EGF (Peprotech) y 2% de Matrigel.

2.17.2. Inmunofluorescencia 3D.

Para el estudio de la formación de acinos mediante microscopia confocal, el día de recogida, los acinos se fijaron en la propia placa de cultivo, con 400 µl de una solución al 4% de Formalina (Sigma HT501128) en PBS, durante 20 minutos y a temperatura ambiente. Después se lavaron 3 veces durante 10 minutos con 400 µl de una solución PBS/Glicina 1X a temperatura ambiente (diluir PBS-Glicina 10X en agua).

A continuación se realizó un primer bloqueo con 400 µl de Tampón IF Wash 1X (diluir IF WASH 10X en agua) + 10% de suero de cabra (Sigma, G9023) durante 1 hora a temperatura ambiente. El segundo bloqueo se realizó con 200 µl de una solución IF Wash 1X + 10% de suero de cabra + 1:100 de F(ab)₂ (Jackson ImmunoResearch 115-006-006) durante 30-40 minutos a temperatura ambiente.

La incubación con el anticuerpo primario se dejó toda la noche en agitación muy suave a 4°C con el anticuerpo primario deseado, a una concentración de 1:100 en 200 µl de bloqueo secundario. Al día siguiente se lavan los pocillos 3 veces con 400 µl de IF Wash 1X a temperatura ambiente, con agitación muy suave durante 20 minutos. Seguidamente se incuban las muestras con el anticuerpo secundario correspondiente en 200 µl de una solución IF Wash 1X + 10% de suero de cabra, en oscuridad, a temperatura ambiente y en agitación muy suave durante 1 hora. Tras la incubación se vuelven a lavar 3 veces durante 20 minutos cada una, con IF Wash 1X, en oscuridad, a temperatura ambiente y en agitación muy suave. Posteriormente, se incubaron con 20ng/ml de una solución DAPI (Sigma, D9542) en PBS, durante 15 minutos en oscuridad. Se realizó un último lavado en IF Wash 1X, Para el montaje de las muestras se quitó la carcasa con cuidado, obteniendo un porta con el matrigel sobre el que se coloca un cubre que contenía 8 gotas de Prolonggold (Invitrogen). Se dejó secar durante toda la noche a temperatura ambiente sobre una superficie plana y tapado con un papel de aluminio. Al día siguiente el porta se selló con esmalte de uñas y una vez seco se analizaron las muestras por microscopía confocal.

Si no se van a teñir las muestras con ningún anticuerpo, tras el segundo bloqueo se puede añadir directamente la solución de DAPI/PBS, y seguir el protocolo.

2.17.3. Análisis de las muestras por microscopía confocal.

El correcto desarrollo de la morfogénesis y formación de lumen, se analizó en un microscopio confocal espectral (Leica TCS-SP5), utilizando un objetivo HCXPLAPO con un aumento 20X y una apertura numérica de 0.7 de inmersión. El software para la adquisición y análisis de imágenes fue LAS AF. Se analizaron un mínimo de 100 acinos por muestra, obteniendo el porcentaje de acinos vacíos (4 o menos células en el interior del lumen), en los diferentes días del desarrollo morfogénico.

2.17.4 Medios de cultivo y soluciones utilizadas.

Medios de cultivo:

MCF10A CULTIVOS-3D	VOLUMEN
DMEM-F12	500 ml
Suero de caballo (HS)	10 ml
EGF (100 µg/ml)	-
Hidrocortisona (5mg/ml)	50 µl
Toxina colérica (1mg/ml)	50 µl
Insulina (10mg/ml)	500 µl
Glutamina/Penicilina/Estreptomicina	5 ml

Soluciones:

PBS/GLICINA 10X	
NaCl (Sigma-Aldrich #S9625)	38 g
Na ₂ HPO ₄ dibásica heptahidratada (Sigma-Aldrich #S9390)	9,38 g
Na ₂ HPO ₄ monobásica monohidratada (Sigma-Aldrich #S9638)	2,07 g
Glicina (Merck #1.04094.1000)	37,5 g
Hasta 500ml con H ₂ O	
pH 7,4	

IF WASH 10X	
NaCl (Sigma-Aldrich #S9625)	38 g
Na ₂ HPO ₄ dibásica heptahidratada (Sigma-Aldrich #S9390)	9,38 g
Na ₂ HPO ₄ monobásica monohidratada (Sigma-Aldrich #S9638)	2,07 g
NaN ₃ Ázida sódica (Sigma-Aldrich #S8032)	2,5 g
BSA (Applichem-Panreac A6588,0050)	5 g
Tritón x-100 (Sigma-Aldrich #T8787)	10 ml
Tween-20 (Sigma-Aldrich #P1379)	2,05 ml
Hasta 500ml con H ₂ O	
pH 7,4	

2.17.5. Análisis de la muerte celular: tinción por Bromuro de etidio.

Para el análisis de la muerte celular en cultivos 3D, crecemos las células siguiendo las instrucciones especificadas en el apartado cultivos tridimensionales de células epiteliales. A día 12 de morfogénesis, cuando los acinos ya se encuentran bien formados, tratamos las células con TRAIL a 100ng/ml durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo, eliminamos el medio de los cultivos 3D y añadimos 500 µl/pocillo de una solución 1µM de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich) en PBS. Incubamos durante 15 minutos a 37°C, tras los cuales eliminamos la solución de bromuro de etidio (EtBr) y añadimos PBS 1X a los pocillos. El análisis de muerte celular lo realizamos mediante inmunofluorescencia indirecta en un microscopio equipado con una lámpara de mercurio. Las células positivas para EtBr se detectan en el canal de la rodamina. Consideramos un acino como positivo para muerte

celular si contenía dos o más células teñidas por EtBr. Se contaron 200 estructuras por pocillo.

2.18. Ensayo de mamosferas.

Para analizar la capacidad “stem cell” de cultivos celulares de mama, se desarrollaron ensayos de crecimiento de mamosferas en condiciones de cultivo en baja adherencia.

La primera selección consistió en sembrar en placas de 96 pocillos de baja adherencia (Costar 3474, Corning) 1000 células individuales en 200ul de medio de crecimiento/pocillo, previamente filtradas a través de un filtro de 30mm. Se sembraron 48 pocillos por tipo celular y se dejaron crecer en el incubador a 37°C en una atmósfera humidificadas con un 5% de CO₂ durante 1 semana. Transcurrido este tiempo, se seleccionaron las esferas primarias y se disociaron enzimáticamente con tripsina al 0,05% durante 15 min a 37°C, obteniendo una suspensión de células individuales que se sembraron a una densidad de 0,5 células/pocillo en placas de 96 pocillos de baja adherencia. Se sembraron de 3 placas de 96 pocillos por tipo celular que se dejaron crecer en el incubador a 37°C en una atmósfera humidificadas con un 5% de CO₂ durante 3 semanas.

La habilidad para generar mamosferas se definió al tercer pase consecutivo, mediante contaje de las estructuras esferoideas en el microscopio óptico.

2.19. Ensayo de tumorigenicidad: Crecimiento en Soft-Agar.

Para evaluar la transformación celular in vitro empleamos un ensayo de formación de colonias en agar blando.

Para ello, las células fueron despegadas con tripsina y resuspendidas en medio de crecimiento. A continuación, placas de 6 pocillos que habían sido previamente cubiertas con una solución al 0,75% de agarosa de bajo punto de fusión en medio de crecimiento (2.18.3) se cubrieron con la suspensión de células (5×10^3 células/pocillo) en 0,45% de agarosa de bajo punto de fusión (2.18.4). Las placas se incubaron durante 2-3 semanas a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂. Los experimentos se realizaron por triplicado. Finalmente y para evitar que el agar se seque, 2 veces por semana se añadieron 200μl/ pocillo de medio de crecimiento 2X.

- Preparación del stock de agarosa de bajo punto de fusión.

Necesitaremos dos tipos de disoluciones de agar de distinta rigidez. Para ello prepararemos un stock que autoclavaremos, alicuotaremos y mantendremos guardado a 4°C.

Base Agar	
Agarosa de bajo punto de fusión	1,5% de agarosa en H ₂ O.
Top Agar	
Agarosa de bajo punto de fusión	0,9% agarosa en H ₂ O.

- **Preparación de medio de crecimiento 2X.**

Prepararemos un medio fresco de crecimiento doblemente concentrado.

Medio crecimiento 2X	Volumen
DMEM F12+ glutamina	50 ml
PS 2X	1 ml
HS 2X	5 ml
EGF 2X	20 µl
INSULINA 2X	100 µl
HIDROCORTISONA 2X	10 µl
Toxina colérica	10 µl

- **Preparación de las placas cubiertas con “Base Agar”**

En primer lugar, mezclamos en proporción 1:1 agarosa 1,5% con medio de crecimiento 2X. Añadimos lentamente por el lateral de la placa y con cuidado de no hacer burbujas a placas de 6 pocillos 1,5 ml/pocillo y dejamos solidificar a temperatura ambiente en la cabina de flujo laminar mientras preparamos las células.

- **Preparación del “Top Agar”**

Por otro lado, para preparar el Top Agar, mezclamos en proporción 1:1 agarosa 0,9% con medio de crecimiento 2X.

2.20. Análisis de marcadores CD44⁺/CD24^{-/low}.

Para analizar el porcentaje de células madre tumorales o con características tipo *stem cell like* realizamos un análisis por citometría de flujo de los marcadores de superficie CD24 y CD44. Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos a una densidad de 5×10^5 células por pocillo en medio completo y mantenidas una noche a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂. Al día siguiente y tras recibir el tratamiento oportuno fueron despegadas con tripsina y se recogieron en tubos de 5 ml de citometría de fondo redondo (Falcon) que mantendremos en hielo durante todo el proceso. A continuación, las células fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C y lavadas 2 veces con PBS 1X, tras lo cual fueron incubadas con una solución 0,5% BSA en PBS durante 30 minutos a 4°C y en oscuridad. Transcurrido ese tiempo, las células se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C y se lavaron 2 veces con PBS 1X. Finalmente, las células se resuspendieron

en 100 μ l de PBS 1X /muestra y se incubó con el anticuerpo correspondiente a una concentración de 5 μ g/ml durante 30 min a 4°C y en oscuridad. Las células fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C y lavadas 2 veces con PBS 1X. Finalmente, se resuspendió el pellet con 500 μ l de PBS 1X/ tubo. La detección de los marcadores se realizó con un citómetro de flujo FACScalibur, utilizando el programa Cell Quest Pro (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) para el análisis de los datos.

Anticuerpo	
IgG2b-FITC (Dako X0941)	Control autofluorescencia
PE- antihuman CD24 (BD pharmigen 55428)	FL2 (545 nm)
FITC- antihuman CD44 (BD pharmigen 555478)	FL1 (460 nm)

2.21. Análisis estadístico.

Todos los datos se presentan como la media \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. La significación estadística se determinó mediante la aplicación de la prueba T-Student. Un valor de p menor de 0.05 se consideró estadísticamente significativo.

Resultados

CAPITULO I: Papel de las rutas de señalización MAPK/ERK y PI3K/AKT en la señalización de apoptosis por el ligando TRAIL.

1.1 La Inhibición prolongada de la ruta de MAPK/ERK en células epiteliales de mama, incrementa los niveles de FLIP e inhibe la apoptosis inducida por TRAIL.

La principal característica de TRAIL y la razón por la cual es considerado un atractivo agente antitumoral, es su selectiva habilidad para inducir apoptosis en células tumorales sin dañar los tejidos sanos, tanto in vitro como in vivo (Ashkenazi 2008). Por ello, la actividad de TRAIL recombinante y de anticuerpos agonistas frente a los receptores pro-apoptóticos de TRAIL ha sido evaluada en diversos ensayos clínicos (Hotte et al. 2008; Lim et al. 2013; Merchant et al. 2012; Wainberg et al. 2013). Sin embargo, aunque TRAIL puede inducir apoptosis en numerosas líneas celulares tumorales, una gran parte de células cancerosas primarias presentan resistencia a la monoterapia con TRAIL. Resistencia que, en muchos casos puede ser vencida mediante el uso de terapias que combinan la acción de TRAIL con radioterapia y/o quimioterapia (Palacios et al. 2014; Lemke et al. 2014).

La activación del receptor de TRAIL posee un efecto antitumoral mediante la inducción de apoptosis dependiente de caspasas en células sensibles, mientras que en células resistentes, TRAIL puede inducir señales no apoptóticas, que resultan en la activación de diversas quinasas (RIP1, I κ B/NF κ B, MAPK p38, JNK, ERK1/2, MAP3K TAK1, PKC, PI3K/AKT y Src) implicadas en proliferación, supervivencia, migración/invasión y angiogénesis (Azijli et al. 2013). De hecho, hay estudios que muestran como un tratamiento con TRAIL in vivo, potencia la metástasis en un modelo ortotópico de cáncer pancreático (Ishimura et al. 2006). Igualmente, se ha demostrado en modelos de ratón de cáncer de pulmón, adenocarcinoma pancreático y cáncer colorrectal, como la expresión endógena de TRAIL-R favorece el crecimiento tumoral y la metástasis así como la migración, proliferación e invasión (Hoogwater et al. 2010; Takahashi et al. 2013; von Karstedt et al. 2015). Todo esto sugiere una función pro-tumorigénica del sistema TRAIL/TRAIL-R en células resistentes a la apoptosis, por lo que resulta de vital importancia entender la señalización no apoptótica de TRAIL con el objetivo de poder evitarla.

Los efectos de la activación del receptor de TRAIL en células resistentes son similares a los observados en células normales no transformadas resistentes, lo que sugiere que los mecanismos pro-tumorigénicos de TRAIL en líneas tumorales resistentes son parte de la señalización fisiológica normal en células no transformadas. Sin embargo, es importante destacar que la mayoría de las terapias combinadas empleadas para sensibilizar a las células tumorales a TRAIL, no dañan las células

normales, lo que nos indica que se estarían produciendo cambios específicos en las células tumorales que permitirían la activación de la apoptosis.

Muchos estudios han intentado descifrar el proceso molecular responsable de esta doble señalización de TRAIL. Aun así, poco se sabe sobre los mecanismos moleculares implicados en la activación de estas rutas de señalización alternativas inducidas por TRAIL en células normales. Por todo esto, descifrar el sistema por el que se regula la señalización no apoptótica inducida por TRAIL, así como identificar las proteínas que pudieran potenciar la señalización apoptótica frente a la no apoptótica, nos permitiría desarrollar estrategias más eficientes que mejoraran la actividad de los agonistas frente a los receptores de TRAIL para el tratamiento contra el cáncer (Azijli et al. 2013).

Por ello, y con el objetivo de entender los mecanismos que controlan la diferente sensibilidad de células normales y tumorales de mama al ligando de muerte TRAIL, decidimos estudiar **cuál es el papel de las rutas de MAPK/ERK y PI3K/AKT en la señalización de apoptosis por TRAIL**.

En primer lugar, determinamos si el tratamiento con TRAIL inducía la activación de las rutas de MAPK/ERK y PI3K/AKT, para ello y como estamos interesados en conocer cuál es la regulación de la señalización de TRAIL en líneas normales, empleamos la línea celular epitelial de mama no transformada MCF10A.

El medio de cultivo de estas células se encuentra suplementado con EGF (Factor de crecimiento epidérmico), lo que provoca que los niveles basales de ERK1/2 fosforilado sean muy altos y resulte complicado observar una activación por encima de éstos. Para evitarlo, privamos a las células de EGF durante 24 horas previo a la adición de TRAIL, punto en el que los niveles de p-ERK1/2 se mantienen bajos, sin afectar a los niveles de FLIP o a la sensibilidad de las células a TRAIL (Yerbes et al. 2012). De esta manera, el tratamiento de células MCF10A con TRAIL nos muestra una activación temprana de las rutas de MAPK/ERK y PI3K/AKT determinada por la fosforilación de ERK1/2 y de los sustratos de AKT (**Figura 1A**).

Para saber si la activación de estas rutas de señalización no apoptótica era dependiente de caspasa 8, generamos mediante infección lentiviral de un shRNA de caspasa 8, células MCF10A con bajos niveles de esta proteína. El vector lentiviral codifica igualmente para la proteína fluorescente GFP, por lo que la expresión de ésta sería indicativa a su vez de la expresión del shRNA. Además, si tratamos estas células con TRAIL, podemos observar como aquellas con bajos niveles de caspasa 8 tienen bloqueada casi en su totalidad la apoptosis inducida por TRAIL (**Figura 1B**). Por tanto, en células MCF10A, TRAIL está activando rutas de señalización apoptóticas y no apoptóticas, ambas de manera dependiente de caspasa 8 (**Figura 1A**).

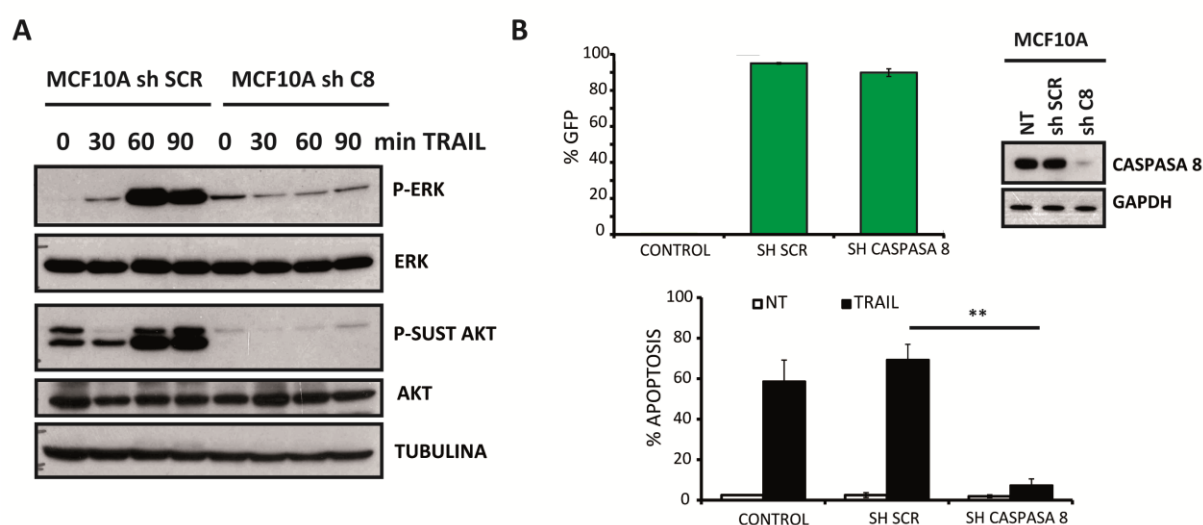


Figura 1 | La inducción de las rutas de MAPK/ERK y PI3K/AKT en células MCF10A por TRAIL es dependiente de caspasa 8. (A) Células MCF10A sh SCR/sh C8 crecieron en ausencia de EGF (20ng/ml) durante 24 horas, tras las cuales fueron tratadas con TRAIL 100ng/ml durante los tiempos indicados (0, 30, 60, 90 min). Los niveles de proteína de p-ERK1/2, ERK1/2, p-sustratos de AKT, AKT fueron analizados por Western-Blot. Los niveles de Tubulina se emplearon como control de carga. (B) Células MCF10A infectadas tal y como se describe en materiales y métodos, con un shRNA para caspasa 8 (pVLTHM-C8) o con un shRNA control (pVLTHM-Scr) (**panel de la izquierda**) se emplearon para medir el porcentaje de células GFP positivas mediante citometría de flujo y (**panel de la derecha**) los niveles proteína caspasa 8 mediante Western-Blot. (**panel inferior**) Células MCF10A sh scr/shC8 fueron tratadas con TRAIL (500ng/ml) durante 6 horas. La apoptosis se midió como el porcentaje de células en subG1 por citometría de flujo, tal y como se describe en materiales y métodos. Los histogramas muestran los valores +/- SEM de al menos 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p > 0,01$, *** $p < 0,001$.

Recientemente, en nuestro grupo se ha demostrado que la inhibición de la señalización del receptor de EGF en distintas líneas celulares epiteliales de mama, por una retirada prolongada de EGF o por tratamiento con gefitinib (inhibidor del receptor de EGF), provoca el aumento de expresión de la isoforma cFLIP(L) y hace estas células más resistentes a TRAIL (Yerbes et al. 2012). Estos datos junto con la activación temprana inducida por TRAIL de las rutas de MAPK/ERK y PI3K/AKT que observamos en la figura 1A, nos incitó a examinar en células humanas epiteliales de mama, la función de estas rutas de señalización en la apoptosis inducida por TRAIL.

Para evaluar el papel de la ruta de PI3K/AKT, decidimos utilizar el inhibidor GSK690693, el cual se ha descrito como específico para la inhibición de las quinasas AKT1, AKT2 y AKT3 (Heerding et al. 2008; Rhodes et al. 2008) y para evaluar el papel de la ruta de MAPK/ERK utilizamos el inhibidor de MEK1, U0126 (DeSilva et al. 1998), a las dosis en las que previamente habíamos observado una inhibición completa de las vías en estas células.

Como se observa en la figura 2A, tanto la inhibición de las rutas de MAPK/ERK como la de PI3K/AKT durante 15 horas previo a la adición de TRAIL, protege a las células MCF10A frente a la apoptosis,

aunque esta protección es mayor cuando la ruta inhibida es la de ERK1/2. Quisimos evaluar cuál era el efecto de la inhibición de estas rutas en otro modelo y para ello, empleamos la línea epitelial normal de mama HMEC-hTERT. En este caso, no se observa ningún efecto en respuesta al tratamiento con GSK690693, sin embargo y al igual que en las MCF10A, el tratamiento con U0126, bloqueaba significativamente la apoptosis inducida por TRAIL (**Figura 2A**).

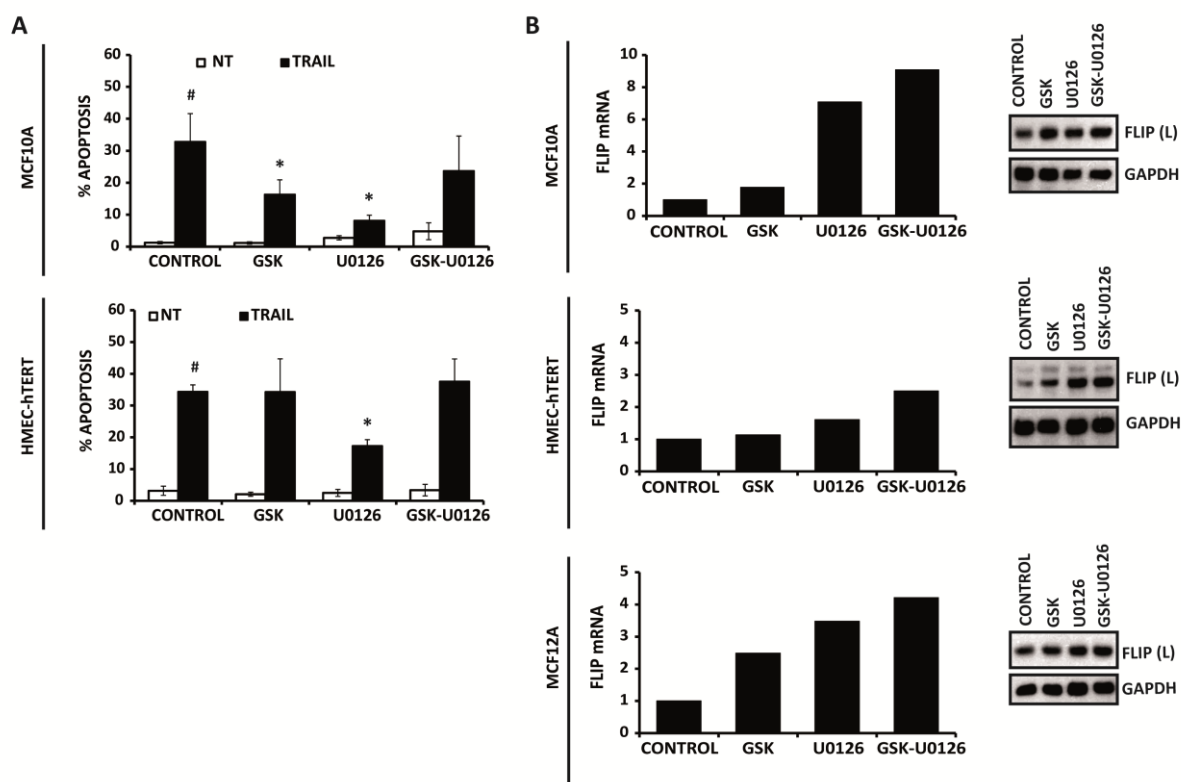


Figura 2 | En células epiteliales de mama, la inhibición prolongada de la ruta de MAPK/ERK, permite el aumento en los niveles de cFLIP(L) y protege a las células de la apoptosis inducida por TRAIL. (A) Células MCF10A y HMEC-hTERT se trataron o no con los inhibidores GSK690963 (10uM) y U0126 (10uM) separados o en combinación durante 15 horas, tras la cuales las células se trataron con TRAIL a 100 y 500ng/ml respectivamente durante 24 horas. La apoptosis se midió como el porcentaje de células en subG1 por citometría de flujo, tal y como se describe en materiales y métodos. Los histogramas muestran los valores +/- SEM de al menos 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. (B) Células MCF10A, HMEC-hTERT y MCF12-A, se trataron o no con los inhibidores GSK690963 (10uM) y U0126 (10uM) separados o en combinación durante 15 horas. Los niveles de FLIP largo fueron analizados por RT-QPCR y por western blot. La proteína GAPDH, se usó como control de carga.

Basándonos en el efecto que la retirada prolongada de EGF tiene en estas células, decidimos estudiar si se estaba produciendo algún cambio en los niveles de cFLIP largo, debido a la inhibición de las rutas de MAPK/ERK y PI3K/AKT. La figura 2B muestra como en células MCF10A, principalmente la inhibición de la ruta de MAPK/ERK induce un aumento en los niveles de FLIP largo tanto a nivel de proteína como a nivel de RNA mensajero, lo que correlaciona con la mayor resistencia de estas

células a TRAIL. El efecto, de la inhibición de estas rutas sobre los niveles de FLIP, se observa también en otros 2 modelos de líneas celulares normales dependientes de EGF, HMEC-hTERT y MCF12-A (**Figura 2B**).

Todos estos resultados indican que, en células humanas epiteliales de mama, la ruta de MAPK/ERK colabora en el mantenimiento de niveles reducidos de cFLIP(L) y tiene, por lo tanto, un papel pro apoptótico frente a la activación de los receptores de TRAIL.

1.2 El tratamiento simultáneo de TRAIL y los inhibidores de MAPK/ERK y PI3K/AKT, potencia la apoptosis inducida por TRAIL en células normales epiteliales de mama.

Los resultados anteriores contrastan con las observaciones de otros grupos en células tumorales en las que la activación de las rutas de MAPK/ERK y PI3K/AKT ha estado siempre relacionada con la supervivencia celular, previniendo la inducción de apoptosis, y que la inhibición de estas rutas incrementa la sensibilidad de las células a la apoptosis inducida por TRAIL (Gibson et al. 2002; Zhang et al. 2003; Vaculová et al. 2006).

En todos estos trabajos en líneas de células tumorales, el tratamiento con los inhibidores de las rutas de señalización se realiza de manera simultánea al tratamiento con TRAIL, por lo que decidimos examinar cual sería la sensibilidad de distintas líneas epiteliales de mama no tumorales a TRAIL, cuando éste se añade al mismo tiempo que los inhibidores. Sorprendentemente y en contraste con los resultados obtenidos al inhibir la ruta de MAPK/ERK y PI3K/AKT de manera prolongada antes de tratar con TRAIL, el tratamiento simultáneo con los inhibidores específicos y TRAIL aumenta la sensibilidad de las células MCF10A a la apoptosis. Cabe destacar que esta sensibilidad es aún mayor cuando inhibimos ambas rutas y tratamos con TRAIL al mismo tiempo. La sensibilización por el cotratamiento con los inhibidores de ambas rutas y TRAIL, la observamos también en las otras 2 líneas epiteliales de mama HMEC-hTERT y MCF12-A (**Figura 3A**). Así, en este contexto, nos encontramos con que las rutas de MAPK/ERK y AKT están desempeñando un papel de supervivencia o anti-apoptótico.

El siguiente paso fue identificar qué receptor de TRAIL está implicado en esta activación de la apoptosis. Como ya se ha indicado en la introducción de esta tesis, existen dos receptores pro-apoptóticos de TRAIL, TRAIL-R1/DR4 Y TRAIL-R2/DR5. Las células de mama y en concreto la línea celular MCF10A expresan principalmente TRAIL-R2/DR5, razón por la cual decidimos silenciar la expresión de esta proteína mediante siRNA y evaluar la sensibilidad de estas células a TRAIL. El silenciamiento de TRAIL-R2/DR5 reduce la apoptosis inducida por el cotratamiento de TRAIL y los inhibidores específicos GSK690963 y U0126 (**Figura 3B**). El hecho de que la muerte no se encuentre

completamente bloqueada, puede deberse a distintos factores. Por un lado, el silenciamiento de TRAIL-R2/DR5 no es total, por lo que aquella población que no haya perdido la expresión del receptor de TRAIL (DR5) va a seguir siendo sensible. Por otro lado, aunque mucho menos que TRAIL-R2/DR5, las células MCF10A también expresan ciertos niveles de DR4, que podrían estar señalizando para apoptosis.

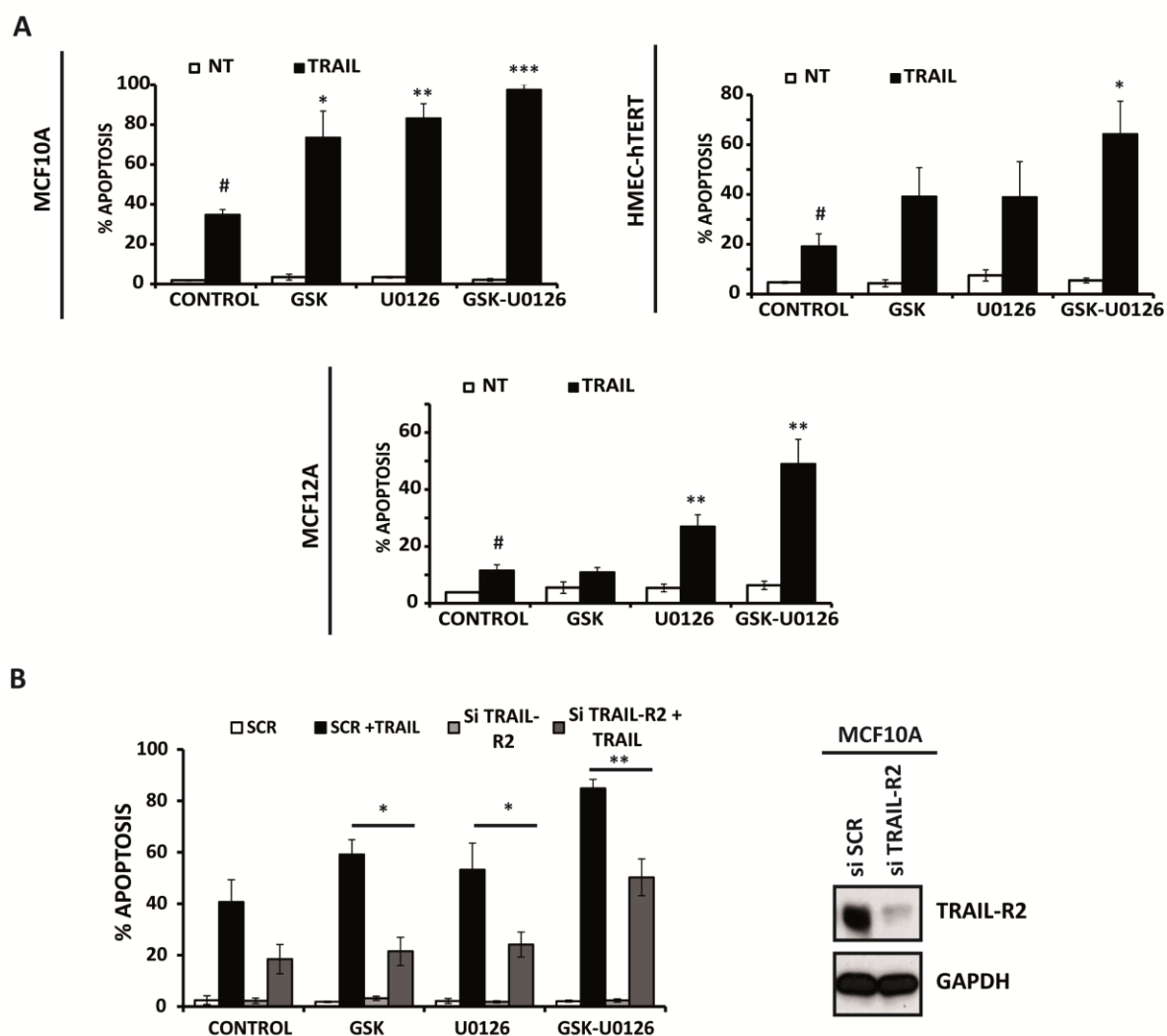


Figura 3 | El tratamiento simultáneo de los inhibidores de la ruta de MAPK/ERK y PI3K/AKT favorece la apoptosis inducida por TRAIL. (A) Células MCF10A, HMEC-hTERT y MCF12-A se trataron o no con los inhibidores GSK690963 (10uM) y U0126(10uM) separados o en combinación y con TRAIL a 100 ng/ml (MCF10A) y 500ng/ml (HMEC-hTERT y MCF12-A) durante 24 horas. La apoptosis se midió como el porcentaje de células en subG1 por citometría de flujo, tal y como se describe en materiales y métodos. Los histogramas muestran los valores +/- SEM de al menos 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. **(B)** Células MCF10A se transfectaron con el oligo de RNA de interferencia de TRAIL-R2/DR5 o scrambled durante 48 horas tal y como se describe en materiales y métodos, tras esto las células se trataron o no con los inhibidores GSK690963 (10uM) y U0126 (10uM) separados o en combinación y TRAIL (100ng/ml). La apoptosis se midió como el porcentaje de células en subG1 por citometría de flujo. Los niveles de DR5 fueron analizados por western blot. La proteína GAPDH, se usó como control de carga.

A partir de los datos mostrados, podemos concluir que en células normales epiteliales de mama, la ruta de MAPK/ERK tiene un doble papel. Por un lado, en una fase temprana, estaría actuando como ruta de supervivencia inhibiendo la apoptosis inducida por TRAIL, y por otro lado, la actividad de esta ruta estaría regulando negativamente los niveles de FLIP (L) y, de esta forma, permitiendo una mayor activación de caspasa 8 y de la apoptosis inducida por TRAIL.

1.3 El tratamiento simultáneo de TRAIL y los inhibidores de MAPK/ERK y PI3K/AKT, favorece la señalización apoptótica temprana de TRAIL.

La activación de los receptores pro-apoptóticos por TRAIL, induce el procesamiento apical de la procaspasa 8 para generar la subunidad pequeña, p12 y el fragmento intermedio p43/41, el cuál será seguidamente procesado para producir la subunidad catalíticamente activa p18 (Sprick et al. 2000).

Para elucidar el mecanismo de sensibilización de las células epiteliales de mama a TRAIL, inducida por la combinación de los inhibidores específicos y el ligando de muerte, determinamos el procesamiento temprano de la procaspasa 8 en células MCF10A tratadas con TRAIL en combinación con GSK690963 y U0126, observando un incremento significativo en el procesamiento de la procaspasa 8, determinado como la producción del fragmento p43/41 y la subunidad p18 (**Figura 4A**). Del mismo modo, podemos observar, como una hora de tratamiento con los inhibidores es suficiente para inhibir por completo la activación de las rutas de MAPK/ERK y PI3K/AKT, medida como fosforilación de la quinasa ERK1/2 y la fosforilación de los sustratos de AKT, respectivamente (**Figura 4A**).

A continuación, investigamos el papel anti-apoptótico de las rutas de MAPK/ERK y PI3K/AKT en la señalización apoptótica temprana de TRAIL determinando en primer lugar, la habilidad de TRAIL para formar el complejo de muerte DISC en células MCF10A tratadas con TRAIL o con la combinación de TRAIL y los inhibidores específicos GSK690963 y U0126. En la figura 4B, podemos observar como el cotratamiento de TRAIL y los inhibidores específicos de la ruta de ERK y AKT favorece significativamente la formación del DISC. Los niveles de proteína de TRAIL-R2/DR5, FADD y procaspasa 8 unida al DISC del TRAIL es mayor en el caso en que las células han sido cotratadas con los inhibidores específicos y TRAIL (**Figura 4B**).

Por otro lado, recientemente se ha demostrado que TRAIL induce cambios en la localización subcelular de los componentes del DISC con el objetivo de conseguir una completa activación de caspasa 8 (Jin et al. 2009).

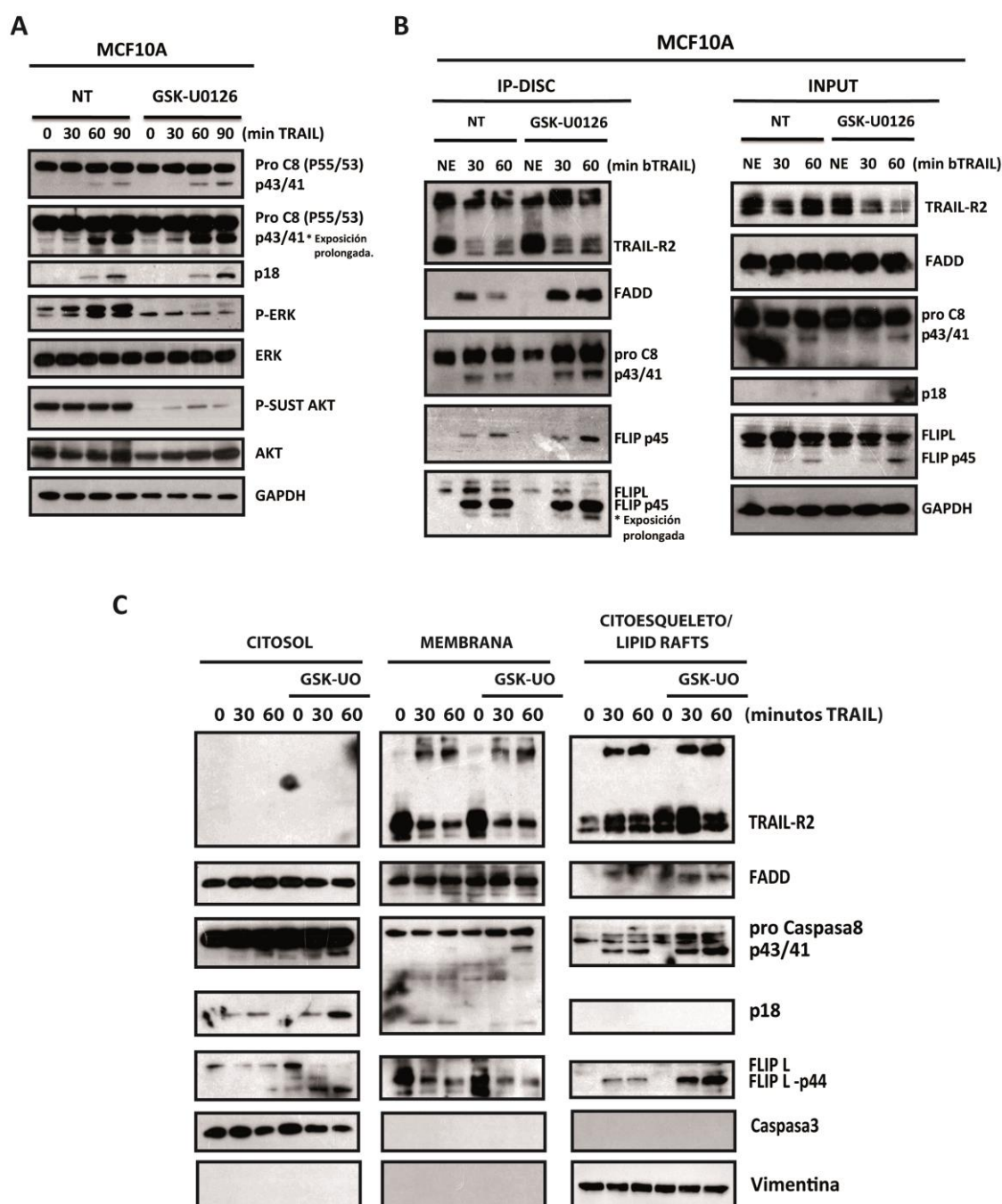


Figura 4 | Señalización temprana inducida por TRAIL. (A) Células MCF10A se trataron o no con los inhibidores GSK690963 (10uM) y U0126 (10uM) en combinación una hora antes del tratamiento con TRAIL a 100ng/ml durante los tiempos indicados. Los niveles de proteína de caspasa-8, p-ERK1/2, ERK1/2, p-sustratos de AKT, AKT fueron analizados por WESTERN-BLOT. Los niveles de GAPDH se emplearon como control de carga. (B) Células MCF10A se trataron o no con los inhibidores GSK690963 (10uM) y U0126 (10uM) en combinación una hora antes de la incubación con TRAIL-biotinilado (b-TRAIL) a 250ng/ml durante 30 y 60 minutos. Los receptores control sin estimular (NE) representan la adición de b-TRAIL a 250 ng/ml al volumen equivalente del lisado aislado procedente de células sin estimular y seguidamente se aisló el DISC tal y como se describe en materiales y métodos. Los niveles de TRAIL-R2, FADD, caspasa-8, FLIP, y GAPDH como control de carga, se analizaron mediante western-blot. Los Inputs, también se incluyen como control de las cantidades de estas proteínas en los lisados celulares. (C) Células MCF10A se trataron como en (A) y seguidamente se sometieron a un fraccionamiento subcelular tal y como se describe en materiales y métodos. Los niveles de TRAIL-R2, FADD, caspasa-8, FLIP, caspasa-3 y vimentina se analizaron mediante western-blot en las fracciones celulares que contienen citosol, membrana plasmática y citoesqueleto/lipid-rafts. Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes.

Para examinar la localización subcelular de los componentes del DISC en células MCF10A tratadas solo con TRAIL o con la combinación de TRAIL y los inhibidores específicos GSK690963 y U0126, realizamos el fraccionamiento celular en diversas fracciones conteniendo citosol, membranas o citoesqueleto/lipid-rafts. Tal y como ya se había descrito (Jin et al. 2009), TRAIL induce un incremento en los niveles proteicos de TRAIL-R2/DR5, FADD y Caspasa 8 en el compartimento que contiene las proteínas del citoesqueleto y las plataformas de lipid rafts. Interesantemente, en las células MCF10A tratadas con la combinación de TRAIL y los inhibidores específicos GSK690963 y U0126, la translocación de las proteínas del DISC, TRAIL-R2/DR5, FADD y Caspasa 8 a la fracción del citoesqueleto y lipid-rafts se ve significativamente incrementada (**Figura 4C**).

Todos estos resultados juntos, nos muestran como la inhibición de las rutas de MAPK/ERK y PI3K/AKT al mismo tiempo que hacemos un tratamiento con TRAIL, favorece los eventos tempranos de la apoptosis inducida por TRAIL en células humanas epiteliales de mama.

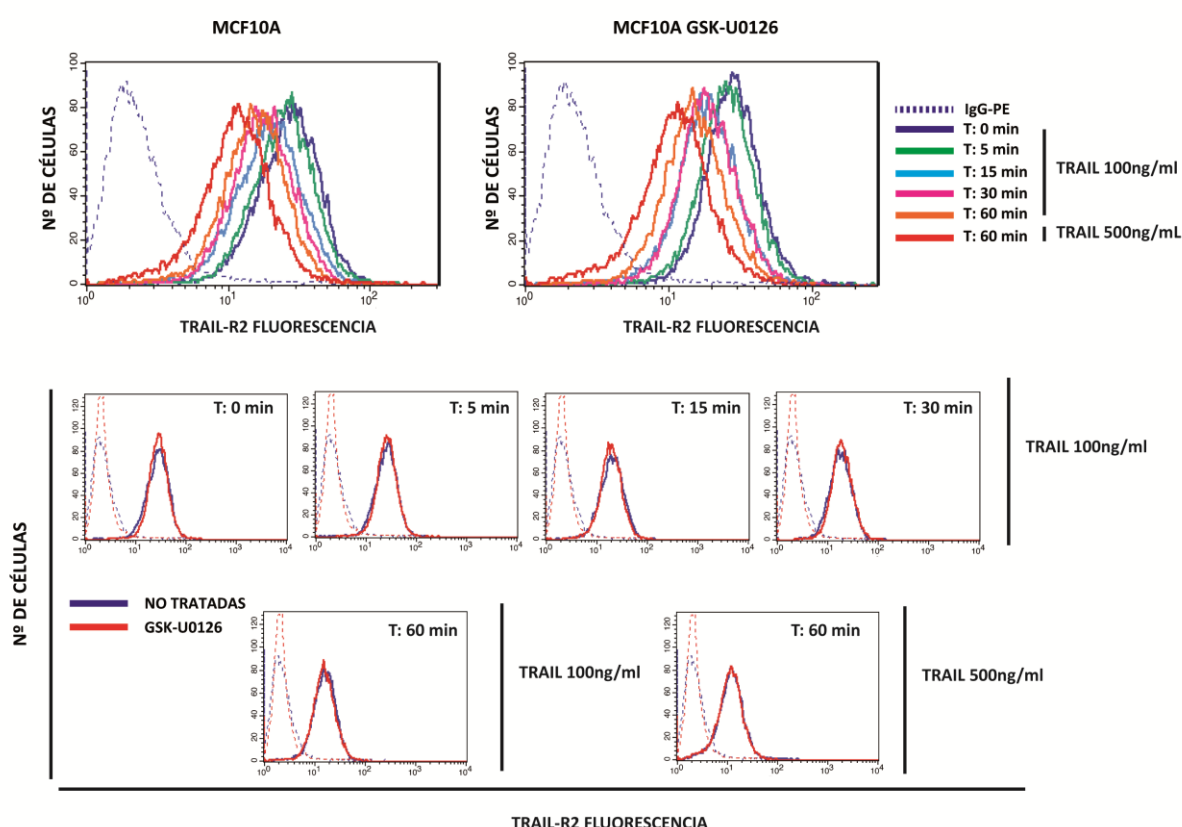


Figura 5 | El efecto pro-apoptótico de la inhibición de las rutas de MAPK/ERK y AKT no se debe a una inhibición de la internalización. Células MCF10A se trataron o no con los inhibidores GSK690963 (10uM) y U0126 (10uM) en combinación durante una hora. La internalización de TRAIL-R2 se midió como el TRAIL-R2 que queda en la membrana después del tratamiento con TRAIL durante los tiempos indicados. La expresión en la superficie celular de TRAIL-R2 fue analizada por citometría de flujo con el anticuerpo específico TRAIL-R2-PE tal y como se describe en materiales y métodos. Células incubadas con la inmunoglobulina IgG-PE se emplearon como control de fluorescencia basal. Los datos mostrados son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

La unión de los ligandos de muerte TNF y FAS(L) a uno de sus receptores en la superficie celular rápidamente conduce a la endocitosis del complejo formado por el ligando y el receptor. La endocitosis de este complejo, ha sido considerada como un mecanismo que impide la apoptosis, ya que el complejo endocitado era normalmente marcado para su degradación lisosomal. Sin embargo, en los últimos años se ha visto, que la internalización y el tráfico intracelular de los receptores de TNF y FAS, puede tener un papel estimulador sobre determinadas rutas de señalización (Gonzalvez & Ashkenazi 2010).

En cuanto al papel de la internalización del receptor en la señalización de TRAIL, se ha descrito que tanto TRAIL-R1/DR4 como TRAIL-R2/DR5 internalizan rápidamente en respuesta a la unión del ligando, a través de un mecanismo dependiente de dinamina. Sin embargo, al contrario que para TNF o FAS ligando, el complejo ligando-receptor de TRAIL, no necesita internalizarse para formar el DISC e inducir apoptosis (Gonzalvez & Ashkenazi 2010). De hecho, hay estudios que indican que la inhibición de la internalización del complejo ligando-receptor de TRAIL favorece la activación de caspasas y la apoptosis (Austin et al. 2006; Akazawa et al. 2009).

Por ello nos planteamos, si las rutas de MAPK/ERK y PI3K/AKT, activadas como parte de la señalización temprana inducida por TRAIL, podrían estar favoreciendo la internalización de TRAIL y frenando en una etapa temprana la apoptosis inducida por TRAIL, razón por la cual, al inhibir estas rutas en presencia de TRAIL, se estaría inhibiendo la internalización del complejo ligando-receptor y se potenciaría la apoptosis. Sin embargo, al estudiar si existía alguna diferencia en la internalización de TRAIL-R2/DR5 entre las células MCF10A tratadas solo con TRAIL o con la combinación de TRAIL y los inhibidores específicos GSK690963 y U0126, no observamos ningún cambio (**Figura 5**).

De este modo, podemos resumir que en células normales no transformadas, TRAIL activa las rutas de señalización de MAPK/ERK y PI3K/AKT de manera dependiente de caspasa-8. La inhibición prolongada de estas rutas con anterioridad al tratamiento con TRAIL aumenta los niveles de FLIP (L) inhibiendo de esta manera la apoptosis inducida por TRAIL (**Figura 6A**). Sin embargo, si las rutas son inhibidas de manera simultánea al tratamiento con TRAIL, los niveles de FLIP (L) no cambian y en contraste se observa una mayor translocación de los componentes del DISC a la fracción de lipid-rafts, una mayor formación del DISC que favorece la activación de caspasa 8 y en consecuencia una mayor sensibilidad de las células a la apoptosis inducida por TRAIL (**Figura 6B**).

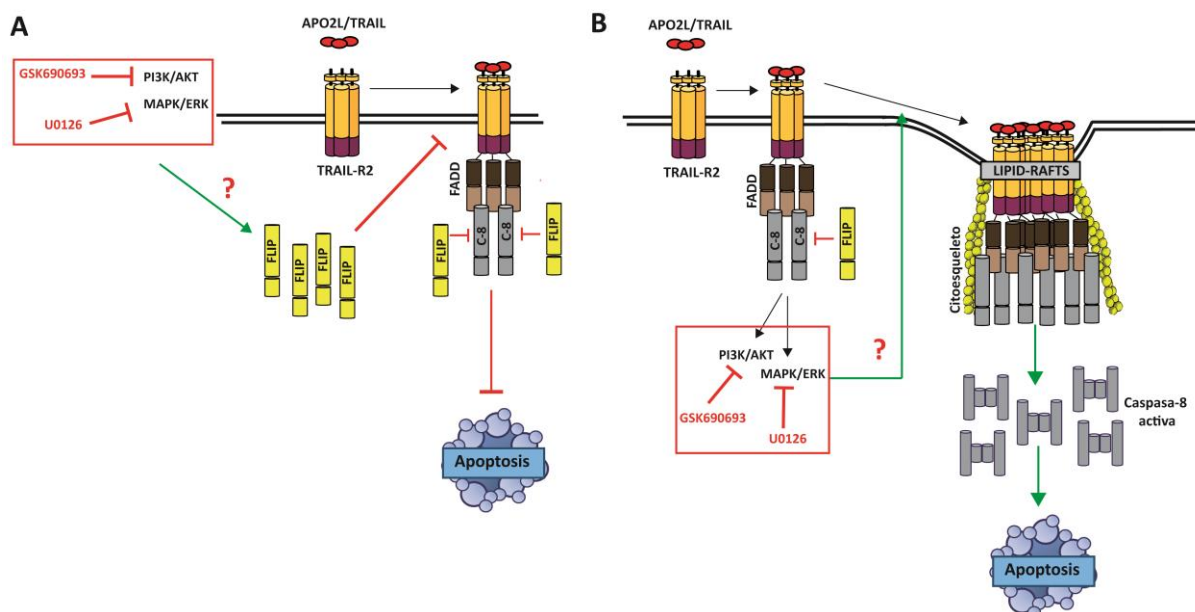


Figura 6 | Papel dual de las rutas de señalización MAPK/ERK y PI3K/AKT en la señalización de apoptosis por el ligando TRAIL en células normales no transformadas.

1.4 Regulación diferencial entre líneas tumorales y normales de los niveles de FLIP (L).

Tal y como comentábamos antes, el papel de las rutas de MAPK/ERK y PI3K/AKT en líneas tumorales siempre se ha descrito como anti-apoptótico, sin embargo, y a raíz de los resultados obtenidos al inhibir de manera prolongada las rutas de MAPK/ERK Y PI3K/AKT antes del tratamiento con TRAIL, nos preguntamos si en líneas tumorales la ruta de MAPK/ERK también posee este doble papel pro y anti-apoptótico.

Para ello, empleamos la línea tumoral de cáncer de cerviz HeLa. En estas células podemos observar la activación por TRAIL de distintas rutas de quinasas, tales como la ruta de AMPK, medida por la fosforilación del sustrato ACC, la ruta de MAPK/ERK, medida por la fosforilación de ERK y la ruta de p38 medida por la fosforilación de una proteína de 90KDa relacionada con MSK1 (**Figura 7A**). Al igual que ocurría en las líneas epiteliales normales de mama, la activación por TRAIL de todas estas rutas, dependen de caspasa 8. Así, un siRNA específico frente a caspasa 8, bloquea significativamente la activación por TRAIL de las rutas de AMPK, MAPK/ERK y p38 (**Figura 7B**).

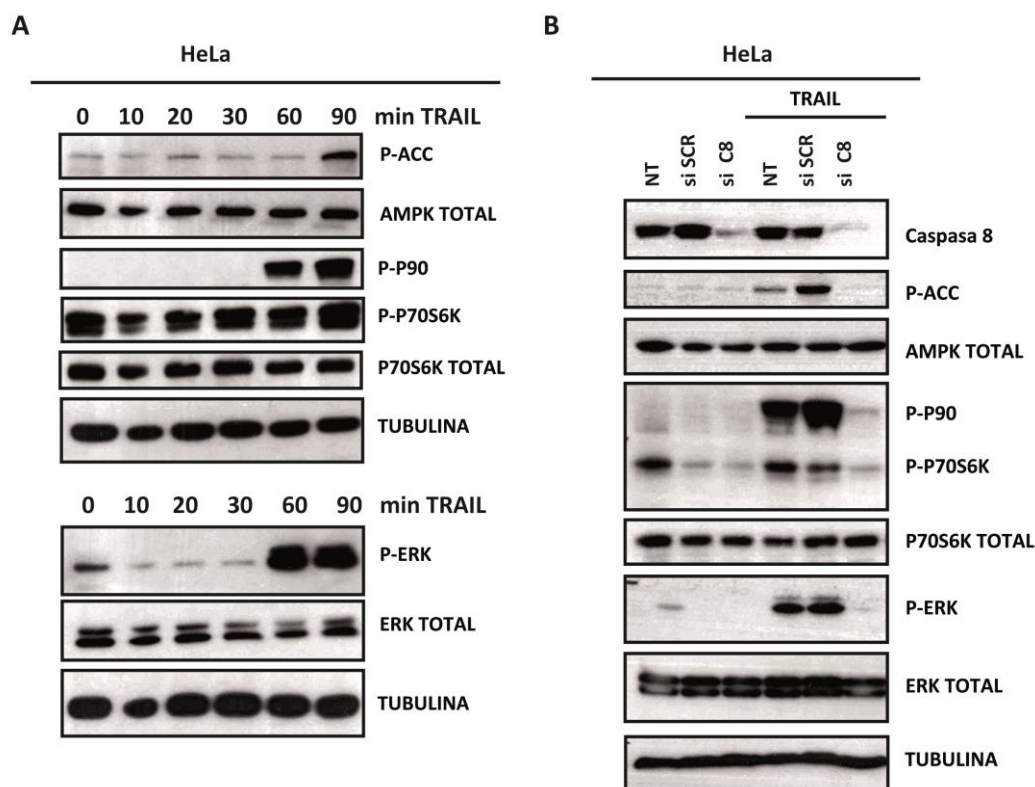


Figura 7 | La inducción de las rutas de quinasas en células HeLa por TRAIL es dependiente de caspasa 8. (A) Células HeLa se trataron TRAIL 500ng/ml durante los tiempos indicados (0, 30, 60, 90 min). Los niveles de proteína de p-ACC, AMPK, p-p70 S6K, P70 total, p-ERK1/2 y ERK1/2 fueron analizados por WESTERN-BLOT. Los niveles de Tubulina se emplearon como control de carga. (B) Células HeLa se transfectaron con el oligo de RNA de interferencia de caspasa-8 o scrambled durante 48 horas tal y como se describe en materiales y métodos, tras esto las células se trataron o no con TRAIL (500ng/ml). Los niveles de caspasa-8, p-ACC, AMPK, p-p70 S6K, P70 total, p-ERK1/2 y ERK1/2 fueron analizados por Western-Blot. Los niveles de Tubulina se emplearon como control de carga. Los datos mostrados son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

Del mismo modo que hicimos para líneas no tumorales, decidimos estudiar la sensibilidad de líneas tumorales de distinto origen, al tratamiento combinado de TRAIL y los inhibidores específicos de las rutas de MAPK/ERK y PI3K/AKT.

En primer lugar, quisimos evaluar en células de cáncer cervical HeLa, el efecto del cotratamiento de TRAIL con los inhibidores específicos GSK690963 y U0126. En este caso y al igual que sucede en líneas no tumorales (**Figura 3A**), podemos observar una mayor sensibilización a la apoptosis inducida por TRAIL cuando se combina este con los inhibidores específicos de las rutas de MAPK/ERK y PI3K/AKT, tanto por separado como juntos (**Figura 8A**). Lo mismo ocurre en otras líneas tumorales de distinto origen como las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB231 y T47D y la línea tumoral de cáncer colorrectal HCT116, lo que corrobora el papel anti-apoptótico o de supervivencia de estas rutas descrito ya en diversos estudios.

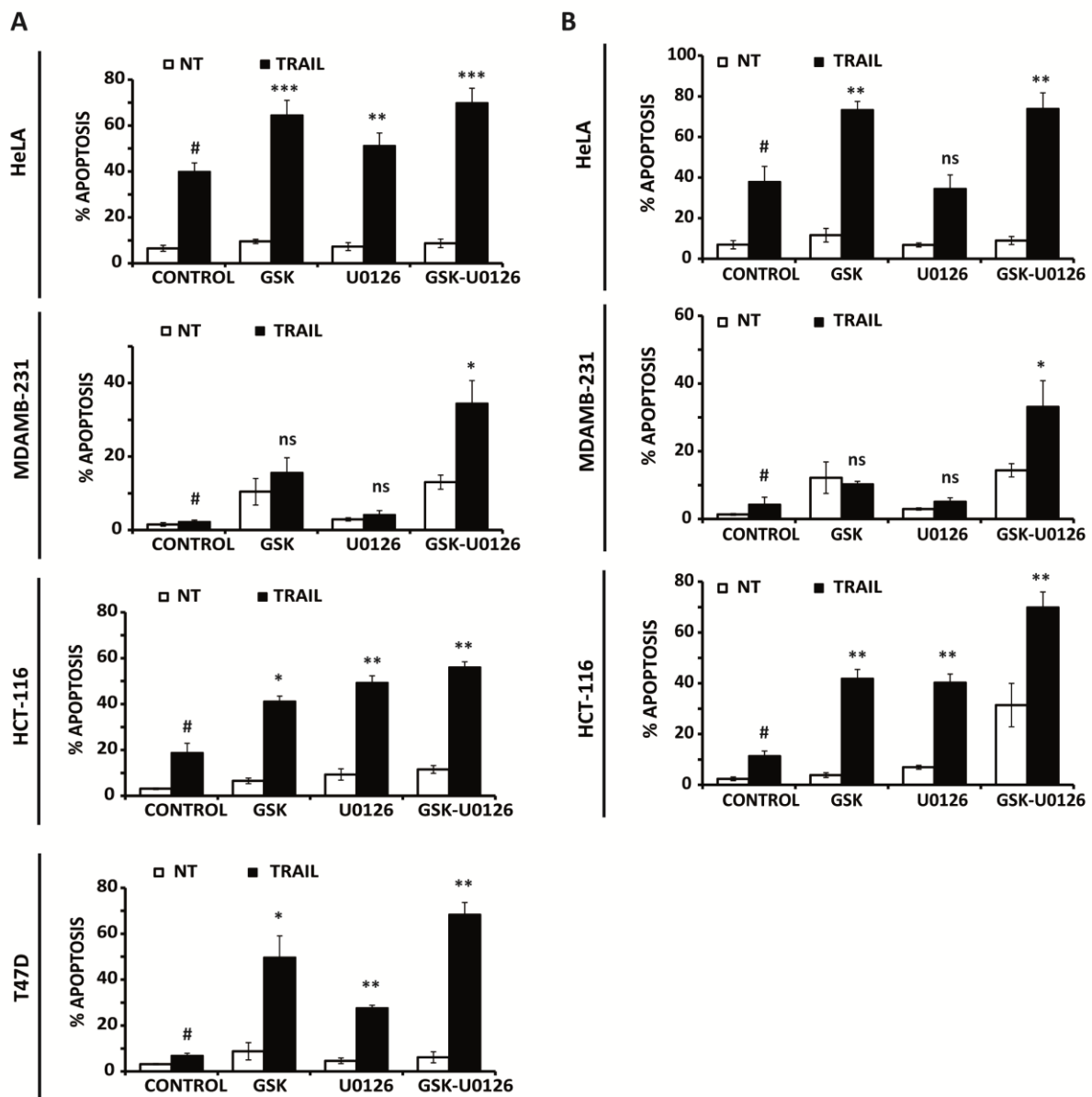


Figura 8 | La inhibición de las rutas de MAPK/ERK y PI3K/AKT en líneas tumorales, favorece en cualquier caso la apoptosis inducida por TRAIL. (A) Células HeLa, MDAMB-231, HCT-116 y T47D se trataron o no con los inhibidores GSK690963 (10uM) y U0126 (10uM) separados o en combinación y con TRAIL a 500 ng/ml (HeLa), 1000ng/ml (MDAMB-231 y T47D) y 10ng/ml (HCT-116) durante 24 horas. **(B)** Células HeLa, MDAMB-231, HCT-116 se trataron o no con los inhibidores GSK690963 (10uM) y U0126 (10uM) separados o en combinación durante 15 horas, tras la cuales las células se trataron con TRAIL a 100ng/ml (HeLa y MDAMB-231) y 500ng/ml (HCT-116) durante 24 horas. La apoptosis se midió como el porcentaje de células en subG1 por citometría de flujo, tal y como se describe en materiales y métodos. Los histogramas muestran los valores +/- SEM de al menos 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Sin embargo, a diferencia de lo que sucede en células no tumorales, cuando analizamos el efecto de la inhibición prolongada de la ruta de MAPK/ERK sobre la sensibilidad a TRAIL, observamos que ésta no se ve afectada en las líneas celulares HeLa y MDA-MB231 e incluso se ve favorecida en la línea HCT116 (**Figura 8B**), en contraposición a lo que habíamos observado en líneas no tumorales (**Figura 2A**).

Una respuesta similar obtuvimos al inhibir la ruta de PI3K/AKT durante 15 horas previa a la adición de TRAIL, haciéndose notablemente más sensibles al tratamiento con TRAIL las líneas celulares HeLa y HCT116 (**Figura 8B**).

En cuanto al mecanismo por el cual la inhibición prolongada de las rutas de MAPK/ERK y PI3K/AKT presenta papeles opuestos, favoreciendo la sensibilidad a TRAIL en líneas tumorales y la resistencia en líneas normales, sabemos que en líneas normales epiteliales de mama, un tratamiento de 15 horas con los inhibidores específicos GSK690963 Y U0126 por separado o en combinación, permite un aumento en los niveles de FLIP (L) tanto a nivel de proteína como de mRNA (**Figura 2B**).

Al analizar que ocurría con los niveles de FLIP(L) en líneas tumorales, observamos como el tratamiento prolongado con el inhibidor específico U0126 prácticamente no afecta a los niveles de proteína y mRNA de FLIP(L), mientras que el tratamiento prolongado con el inhibidor de la ruta de PI3K/AKT y la inhibición conjunta de ambas rutas reduce significativamente los niveles de proteína FLIP(L) (**Figura 9**), lo que correlaciona de manera directa con la sensibilidad a TRAIL anteriormente mostrada (**Figura 8B**).

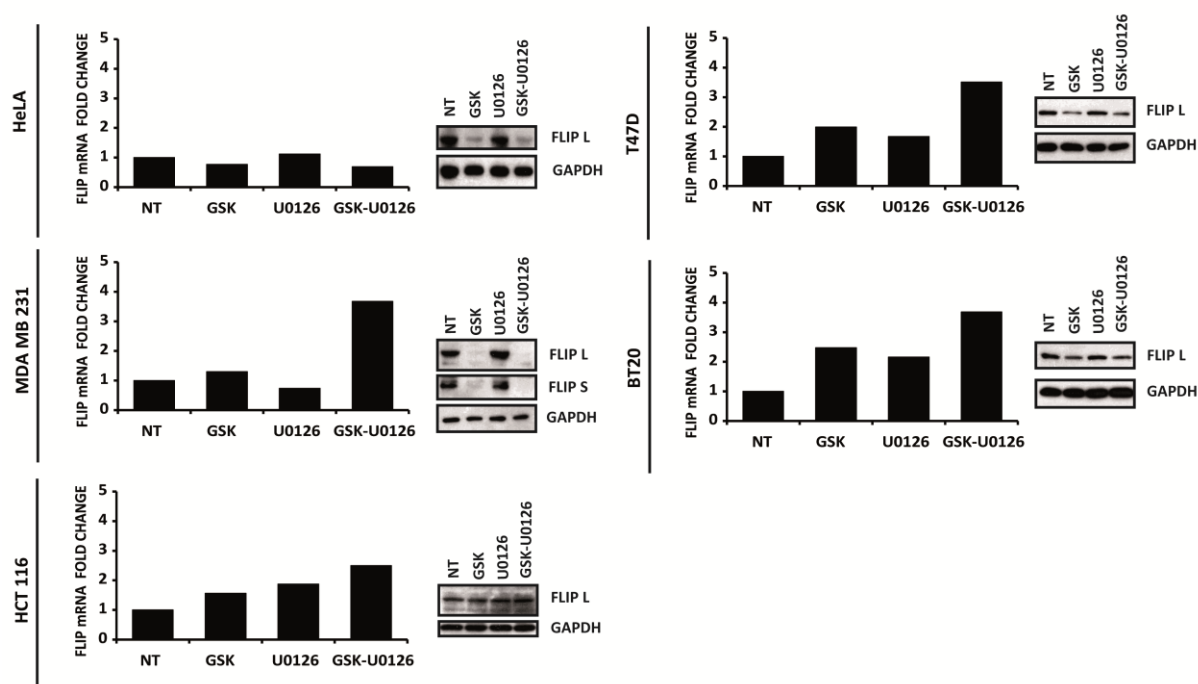


Figura 9 | En líneas tumorales, la inhibición prolongada de las rutas de MAPK/ERK y PI3K/AKT no induce el incremento en los niveles de cFLIP(L). Células HeLa, MDAMB-231, HCT-116, T47D y BT20 se trataron o no con los inhibidores GSK690963 (10uM) y U0126 (10uM) separados o en combinación durante 15 horas. Los niveles de cFLIP largo fueron analizados por RT-QPCR y por western blot, tal y como se describe en materiales y métodos. La proteína GAPDH, se usó como control de carga.

Todos estos resultados sugieren la existencia de una regulación diferencial entre líneas tumorales y no tumorales de los niveles de FLIP(L). Datos anteriores del grupo han demostrado como en células no tumorales MCF10A, la privación de EGF provoca la inhibición de la ruta de ERK1/2 y la disminución de c-myc, permitiendo el aumento en los niveles de FLIP(L) (Yerbes et al. 2012).

C-myc es un miembro de la familia de factores de transcripción Myc que juega un papel fundamental en la regulación del crecimiento celular, en la progresión del ciclo celular y en la apoptosis (Eilers & Eisenman 2008). Por ello, nos preguntamos si en líneas tumorales, c-myc también estaría regulando negativamente los niveles de FLIP(L).

Para ello, llevamos a cabo experimentos de silenciamiento de c-myc mediante un siRNA específico, en los que podemos observar como en células normales MCF10A en presencia de EGF, el silenciamiento de la expresión de c-myc permite el aumento de los niveles de FLIP(L) tanto a nivel de proteína como de mRNA (**Figura 10A**), tal y como había sido previamente descrito. Sin embargo, el silenciamiento específico de c-myc en la línea tumoral de cáncer cervical HeLa, no aumenta los niveles de FLIP(L) (**Figura 10B**).

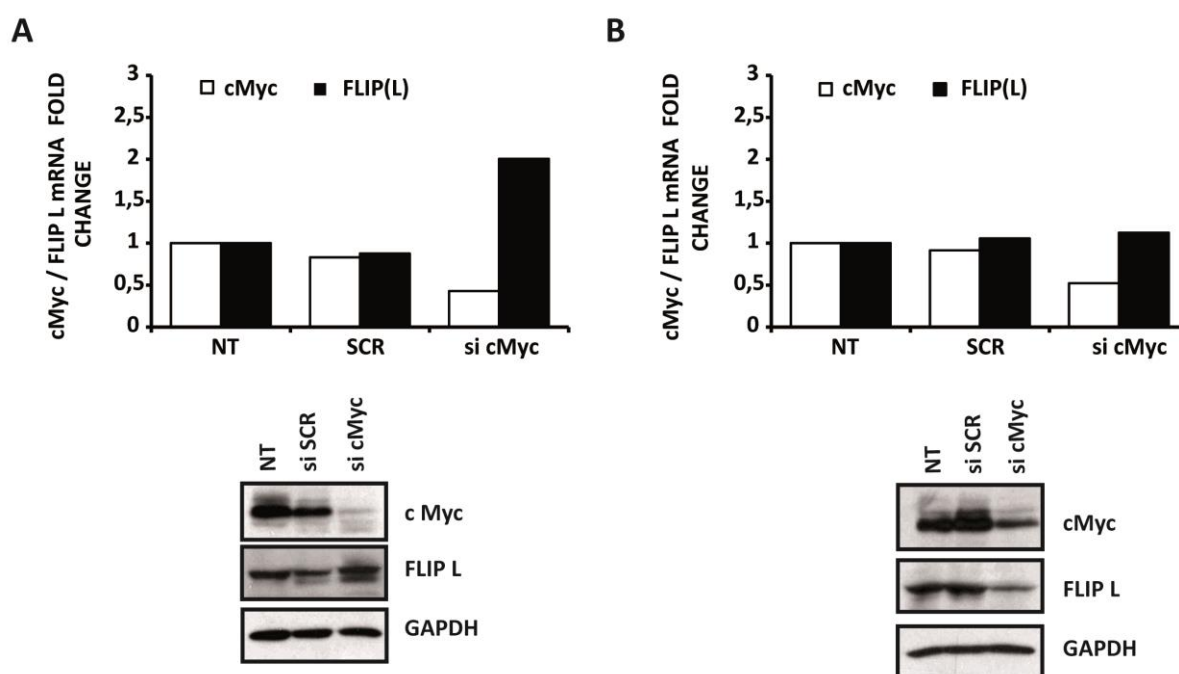


Figura 9 | Regulación diferencial de los niveles de FLIP en líneas normales y tumorales. (A) Células MCF10A y **(B)** Células HeLa, se transfectaron con el oligo de RNA de interferencia de cMyc o scrambled durante 48 horas tal y como se describe en materiales y métodos. Los niveles de cMyc y cFLIP largo fueron analizados por RT-QPCR y por western blot. La proteína GAPDH, se usó como control de carga. Los datos mostrados son representativos de 3 experimentos independientes.

Por tanto, podemos concluir que los niveles de FLIP(L) se encuentra regulados por mecanismos distintos en líneas tumorales y normales, que deben ser investigados en detalle, pues proporcionarían una valiosa información sobre cómo las células tumorales y normales regulan la apoptosis inducida por TRAIL, lo que permitiría establecer nuevas dianas para el tratamiento específico de las células cancerígenas.

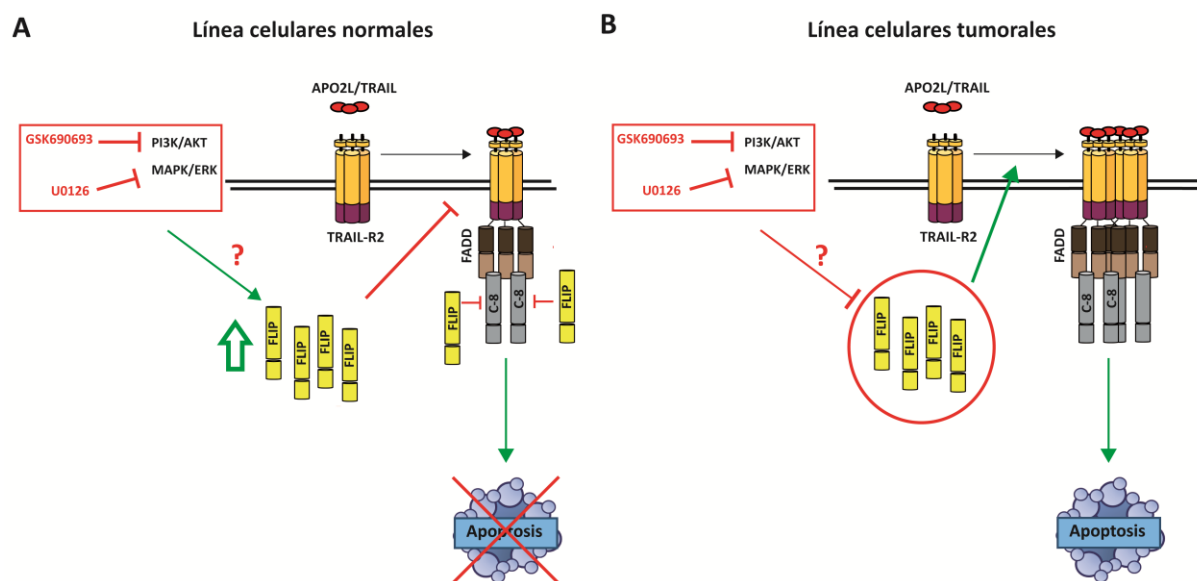


Figura 11 | Respuesta de células normales y tumorales a la inhibición prolongada de las rutas de PI3K/AKT y MAPK/ERK.

CAPITULO II: Regulación por el oncogén ErbB2/Her2 de la activación de apoptosis por TRAIL en células epiteliales de mama humanas.

2.1 Las células epiteliales de mama que sobreexpresan una forma constitutivamente activa del oncogen ErbB2/Her2 muestran características tumorogénicas.

TRAIL es un conocido agente antitumoral con capacidad para matar selectivamente células tumorales sin afectar a las normales, sin embargo, aún son muchas las incógnitas que quedan por resolver relativas a la resistencia de células no tumorales y a la posible resistencia de tumores primarios a estos tratamientos. Por ello y para tratar de entender cuáles son los mecanismos que controlan la diferente sensibilidad de células normales y tumorales al ligando de muerte TRAIL, generamos un modelo celular de células epiteliales de mama humanas que sobreexpresan formas normales (wt) o constitutivamente activas del oncogen ErbB2/Her2/Neu (Haenssen et al. 2010), en el que hemos estudiado la regulación de la sensibilidad a TRAIL.

Los receptores de la familia ERBB/Her modulan el desarrollo de la glándula mamaria y es habitual encontrarlos amplificados, mutados y/o sobreexpresados en tumores de mama. Además realizan importantes funciones tales como regulación de la supervivencia, proliferación celular y metástasis, por lo que la familia ERBB es considerada una atractiva diana terapéutica para el tratamiento del cáncer de mama (Hardy et al. 2011). ErbB2/Her2 es un receptor tirosín quinasa de la familia ERBB/Her frecuentemente expresado en muchos tumores. Alrededor de un 30% de los tumores de mama tienen ErbB2 sobreexpresado, lo cual se asocia además con una mayor agresividad y un peor pronóstico (Normanno et al. 2003; Haenssen et al. 2010). En consecuencia, muchos inhibidores de ErbB2 están siendo usados en la actualidad como tratamiento de cáncer de mama, aunque muchos de ellos pierden su actividad durante tratamientos prolongados por el desarrollo de resistencias secundarias, por lo que es necesaria la identificación de dianas terapéuticas adicionales (Haenssen et al. 2010; Nahta et al. 2006).

El modelo de trabajo que hemos empleado en esta tesis se basa en la línea epitelial de mama MCF10A transformada bien con el oncogen ErbB2(Neu)/Her2 o con una forma mutada constitutivamente activa del mismo, ambos genes de rata, que codifican para un receptor transmembrana tirosín quinasa (Schechter et al.; Wang et al. 2006). En el caso de la forma constitutivamente activa, se trata de una mutación puntual dentro de la región transmembrana del oncogén Neu que resulta en la sustitución de una valina por ácido glutámico en la posición 664 (V664E), lo que induce un incremento importante en la actividad tirosín quinasa y está asociado con transformación tumoral (Weiner et al. 1989; Moasser 2007).

Las líneas estables generadas por infección con vectores retrovirales pBabe las denominamos: **MCF10A pBabe** con el vector retroviral vacío pBabe-puro, **MCF10A pNeuN**, con el vector retroviral pBabe-puro-ErbB2/Neu/Her2 y **MCF10A pNeuT** con el vector pBabe-puro-NeuT (mutado y constitutivamente activo).

En primer lugar, evaluamos las características morfológicas que presentaban las líneas celulares que componen el modelo MCF10A pBabe/pNeuN/pNeuT. La línea celular MCF10A es una línea celular epitelial de mama no transformada, espontáneamente inmortalizada, procedente de tejido de mama de una paciente de 36 años con alteraciones fibroquísticas. Estas células presentan características propias de un epitelio normal de mama tales como, ausencia de tumorigenicidad en ratones desnudos, ausencia de crecimiento independiente de anclaje y crecimiento en cultivo controlado por hormonas y factores de crecimiento (Debnath et al. 2003; Soule et al. 1990). Las células MCF10A presentan una morfología tipo adoquinado característica de células epiteliales de mama. La sobreexpresión del oncogén ErbB2/Her2 no induce cambios significativos en la morfología de cultivos en 2D, tal y como había sido previamente descrito en (Muthuswamy et al. 2001). Sin embargo, la línea celular MCF-10A-pNeuT presenta una morfología alargada, tipo fibroblástica, con una menor adherencia al sustrato, característica de un fenotipo mesenquimal (**Figura 12A**). Igualmente, analizamos también los niveles de proteína del oncogén ErbB2 en los 3 modelos celulares, observando que las líneas pNeuN y pNeuT expresan unos niveles considerablemente más elevados de proteína ErbB2 en comparación con las pBabe. Además, determinamos los niveles proteicos de ErbB2 fosforilado (Tyr1248) como indicador de la actividad del oncogén ErbB2, detectando unos niveles significativamente mayores en la línea pNeuT con respecto a la pNeuN, en la cual aunque podemos observar cierto grado de activación, no es comparable con los niveles detectados en las células NeuT, las cuales presentan una forma mutada y constitutivamente activa del receptor de ErbB2 (**Figura 12B**).

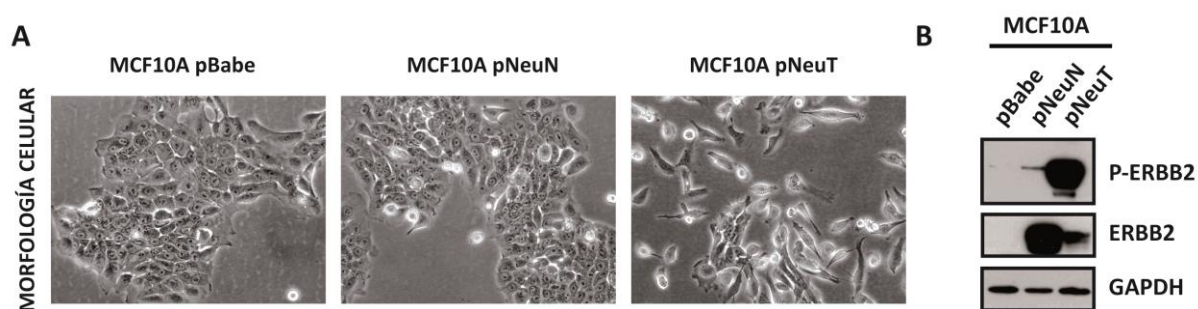


Figura 12 | Modelo celular de células MCF10A que sobreexpresan formas normales (wt) o constitutivamente activas del oncogén ErbB2/Her2/Neu (A) Imágenes representativas obtenidas por microscopía de contraste de fases de células MCF10A pBabe/pNeuN/pNeuT **(B)** Los niveles de expresión de p-ErbB2 (Tyr1248) y ErbB2 se midieron mediante Western-Blot (WB). La Tubulina se empleó como control de carga.

Dadas las diferencias morfológicas observadas en el modelo MCF10A pBabe/pNeuN/pNeuT, decidimos llevar a cabo un análisis más detallado de las propiedades tumorigénicas que presentaban estas células.

En primer lugar, con objeto de analizar la arquitectura morfológica de las células MCF10A in vitro, realizamos cultivos tridimensionales de las células que componen nuestro modelo, sobre una matriz extracelular (Matrigel). El cultivo de células epiteliales de mama en 3D permite reproducir muchas de las características típicas del epitelio de mama in vivo, tales como la formación de acinos (estructuras esféricas con un lumen central y un preciso control del crecimiento y la proliferación celular) y la polarización apicobasal de las células que componen los acinos. Por otra parte, se ha descrito que las células de cáncer de mama no forman acinos cuando crecen en 3D, sino que se desarrollan como estructuras de células no polarizadas y con una diferenciación limitada (Debnath et al. 2003; Debnath & Brugge 2005). La figura 13A y 13B muestran como la activación de ErbB2 (pNeuN) provoca la formación de estructuras multiacinares que presentan un retraso en la formación del lumen y una pérdida de polaridad, tal y como se había demostrado previamente con los receptores de ErbB2 quiméricos (Muthuswamy et al. 2001). De igual modo, la activación constitutiva del oncogén ErbB2 (pNeuT) durante la morfogénesis provoca la aparición de un fenotipo mucho más agresivo, propio del crecimiento de células tumorales en matrigel (Pal & Kleer 2014), caracterizado por la aparición de estructuras tubulares ramificadas e invasivas, sin polarizar, con un crecimiento desorganizado, exceso de proliferación y ausencia de expresión de integrina- $\alpha 6$ (**Figura 13A-B**).

Para medir la capacidad tumorigénica de éstas células, realizamos un ensayo de formación de colonias en soft agar. Las células pNeuT forman un número significativamente mayor de colonias que las células pNeuN (**Figura 13C**), lo que sugiere que la activación constitutiva de ErbB2 proporciona un mayor potencial de transformación a éstas células.

Por otro lado, en los últimos años han emergido 2 nuevos conceptos en el campo de la biología del cáncer: el papel de las denominadas células madre tumorales (Cancer stem cells: CSCs) o células iniciadoras de tumores y la implicación de la transición epitelio mesénquima (EMT) en la diseminación metastásica de las células epiteliales de cáncer (Morel et al. 2008). En tumores de mama, éstas células iniciadoras han sido identificadas como $CD44^+ / CD24^{-/low}$ y son las responsables de la formación y progresión del tumor. Además presentan propiedades progenitoras entre las que destaca su capacidad de autorenovación, la cual junto con el limitado número de células presentes en el conjunto del tumor permite explicar su habilidad para escapar de las terapias convencionales y provocar la reaparición del tumor (Ponti et al. 2005; Al-Hajj et al. 2003).

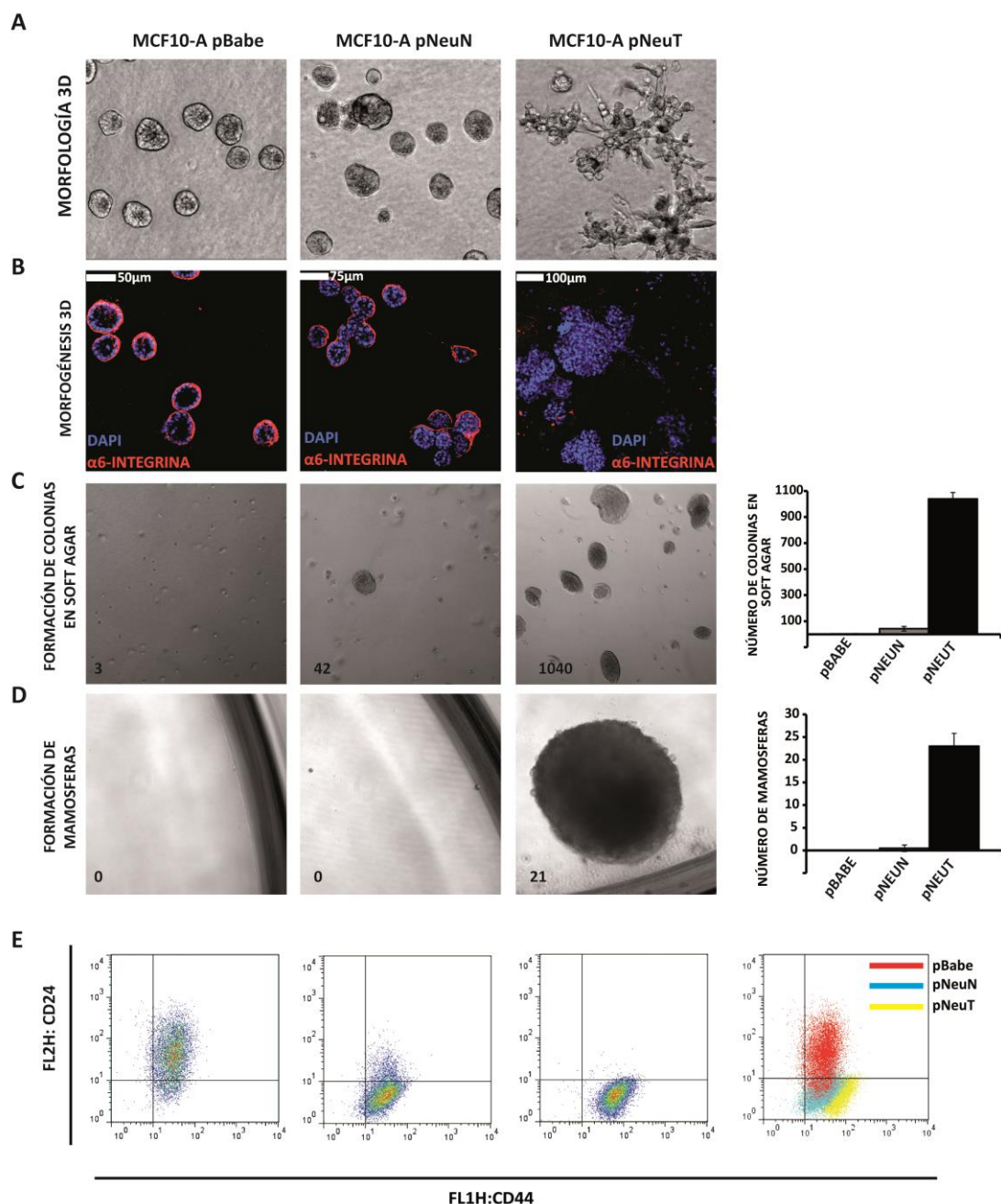


Figura 13 | Células MCF10A transformadas con una forma constitutivamente activa del oncogén ErbB2/Her2 muestran características tumorigénicas. (A) (B) Células MCF10A pBabe/pNeuN/pNeuT se utilizaron para ensayos de morfogénesis en 3D tal y como se detalla en materiales y métodos. Imágenes representativas (A) a día 5 obtenidas por microscopía de contraste de fases y (B) a día 14 obtenidas por microscopía de confocal tras ser fijadas y teñidas con anticuerpos anti- α -integrina. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Muestran la morfología de las células en 3D. **(C)** El potencial de transformación oncogénica se analizó pasadas 3 semanas, mediante un ensayo de formación de colonias tal y como se detalla en materiales y métodos. El número indicado en la parte inferior de la imagen y la gráfica de la derecha representa la media del número de colonias obtenidas en 2 experimentos independientes con 2 duplicados cada uno. **(D)** El ensayo de formación de mamosferas se realizó en condiciones de baja adherencia tal y como se detalla en materiales y métodos. Se cuantificaron el número de mamosferas de cada tipo celular por 48.000 células iniciales. En la gráfica de la derecha se representa la media de dos experimentos independientes. **(E)** Los niveles de expresión de los marcadores de superficie de células madre de mama CD24/CD44 se analizaron mediante citometría de flujo tal con anticuerpos específicos tal y como se describe en materiales y métodos. Células incubadas con la inmunoglobulina IgG-FITC se emplearon como control de la fluorescencia basal. Los datos mostrados son representativos de 3 experimentos independientes.

Recientemente, se ha demostrado la posibilidad de aislar y propagar in vitro éstas células iniciadores de tumores (Dontu et al. 2003; Ponti et al. 2005), por lo que decidimos comprobar si la expresión o activación constitutiva del oncogén ErbB2 (Neu)/Her2, podría provocar la adquisición de características de células madre y tumorigénicas. Para ello, realizamos cultivo de mamíferas tal y como se detalla en materiales y métodos. Las mamíferas son conjuntos esféricos no adherentes de células, enriquecidas en células mamarias progenitoras o stem, que se obtienen en condiciones selectivas de cultivo. La mayor parte de las células que componen la mamíferas son $CD44^+ / CD24^{-/low}$ y entre un 10-20% de éstas conservan su habilidad para autorenovarse (Ponti et al. 2006; Dontu et al. 2003).

En contraste con las líneas MCF10A pBabe/pNeuN, únicamente las células que expresan la forma mutada y constitutivamente activa del receptor de ErbB2 presentan capacidad para crecer formando mamíferas no adherentes, lo que sugiere que han desarrollado propiedades tanto tumorigénicas como de célula madre (**Figura 13D**). Posteriormente analizamos el fenotipo de las 3 líneas celulares en condiciones adherentes, mediante citometría de flujo usando los marcadores CD44 y CD24 (**Figura 13E**). Las células, MCF10A pBabe son $CD44^{low} / CD24^+$. La sobreexpresión del oncogén ErbB2(Neu)/Her2 provoca un cambio en la expresión de estos marcadores que da lugar a un fenotipo intermedio que permite caracterizar a las células MCF10A pNeuN como $CD44^{low} / CD24^{low}$. Finalmente, las células MCF10A pNeuT donde podemos observar una población $CD44^+ / CD24^-$, que confirmaría la capacidad de éstas células para crecer formando mamíferas (**Figura 13D-E**). Todo esto sugiere que células tumorigénicas con características de célula madre ($CD44^+ / CD24^{-/low}$) pueden originarse a partir de células normales epiteliales de mama ($CD44^{low} / CD24^+$) transformadas con el oncogén ErbB2(Neu)/Her2.

2.2 Las células epiteliales de mama que sobreexpresan el oncogén ErbB2/Her2 son más sensibles a la apoptosis inducida por TRAIL.

Una vez establecido el modelo, el siguiente paso fue evaluar cuál era la sensibilidad al ligando de muerte TRAIL en el modelo MCF10A pBabe/pNeuN/pNeuT, y si existía alguna diferencia entre las 3 líneas.

Observamos como las células pNeuT son significativamente más sensibles al tratamiento con diferentes dosis de TRAIL recombinante que las líneas pBabe y pNeuN (**Figura 14A**). Con objeto de profundizar en el mecanismo subyacente a esta sensibilidad diferencial inducida por TRAIL en este modelo, lo primero que analizamos fue si se había producido algún cambio en los niveles basales de proteínas del DISC que pudiera ser responsable de la diferencia de sensibilidad observada.

Sin embargo, los niveles de proteína de Caspasa 8, FLIP(L), FADD y DR5 permanecían sin alterar en las 3 líneas (**Figura 14B, panel superior**). De igual modo quisimos analizar si la transformación de éstas células con la forma mutada y constitutivamente activa del oncogén ErbB2 había supuesto un cambio en los niveles de expresión en membrana del receptor pro-apoptótico TRAIL-R2/DR5. El análisis de expresión de TRAIL-R2/DR5 en la superficie celular reveló que las 3 líneas celulares expresan altos niveles del receptor en la membrana, pero que no existen diferencia entre ellas (**Figura 14B, panel inferior**). Todos estos resultados demuestran que la mayor sensibilidad a TRAIL de las células NeuT no es debida ni a un cambio en los niveles de expresión de las proteínas que forman el DISC de TRAIL ni a una mayor expresión en membrana del receptor pro-apoptótico TRAIL-R2/DR5.

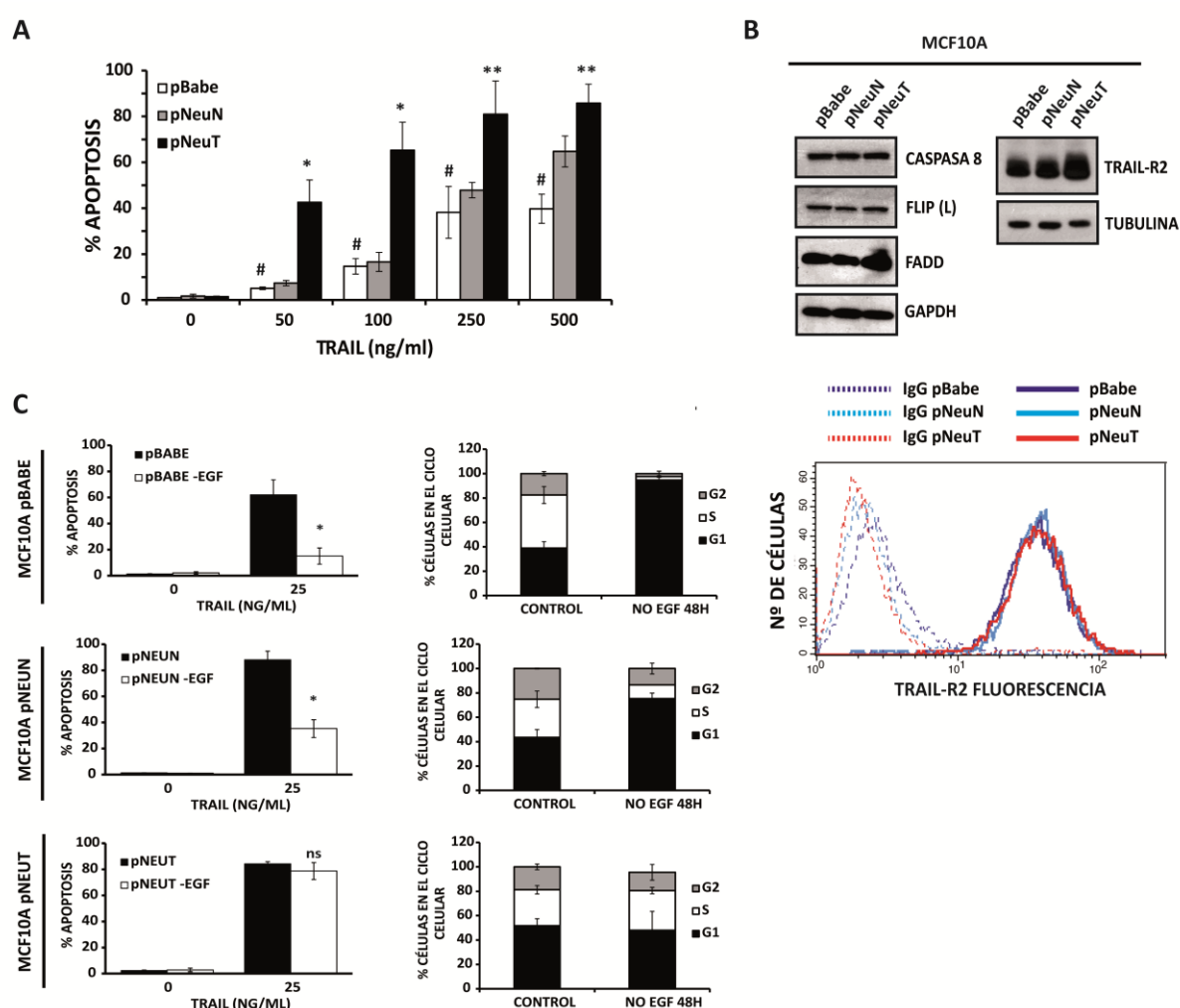


Figura 14 | Sobreexpresión en células MCF10A de una forma constitutivamente activa del oncogén ErbB2/Her2 incrementa la sensibilidad a la apoptosis inducida por TRAIL. (A) Células MCF10A pBabe/pNeuN/pNeuT se trataron con las dosis indicadas de TRAIL durante 24 horas. La apoptosis se midió tras los tratamientos como el porcentaje de células en subG1 por citometría de flujo tal y como se describe en materiales y métodos. Los histogramas muestran los valores \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. Las $p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$. **(B) (panel superior)** Los niveles basales de Caspasa-8, FLIP, FADD y TRAIL-R2 fueron analizados por western blot. Las proteínas GAPDH y Tubulina se emplearon como control de carga. **(panel inferior)** La expresión en la superficie celular de TRAIL-R2 fue analizada por citometría de flujo con el anticuerpo específico TRAIL-R2-PE tal y como se describe en materiales y métodos. Células incubadas con la

inmunoglobulina IgG-PE se emplearon como control de fluorescencia basal. Los datos mostrados son representativos de al menos 3 experimentos independientes. **(C) (panel izquierdo)** Células MCF10A pBabe/pNeuN/pNeuT crecieron en presencia o en ausencia de 20ng/ml de EGF durante 48 horas, tiempo tras el cual se trataron o no con TRAIL a 250ng/ml durante 24 horas. La apoptosis se midió como el porcentaje de células en subG1 por citometría de flujo tal y como se describe en materiales y métodos. Los histogramas muestran los valores \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p > 0,01$, *** $p < 0,001$. **(panel derecho)** Células MCF10A pBabe/pNeuN/pNeuT crecieron en presencia o en ausencia de 20ng/ml de EGF durante 48 horas. El porcentaje de células en cada fase del ciclo celular se realizó mediante citometría de flujo tal y como se detalla en materiales y métodos y se analizó mediante el software (nombre del programa de analiza ciclo). Los datos mostrados con la media de dos experimentos independientes.

Datos anteriores del grupo han demostrado como en células no tumorales epiteliales de mama, la ausencia de señalización de EGFR induce resistencia a TRAIL a través del incremento en los niveles de FLIP(L) y la inhibición de la activación de caspasa 8 (Yerbes et al. 2012). Por lo que decidimos estudiar cuál sería la sensibilidad de las células de este modelo “tumoral-no tumoral”, a la privación de EGF. Observamos que las células pBabe y pNeuN en ausencia de EGF adquieren resistencia a TRAIL, mientras que las células pNeuT no se ven afectadas **(Figura 14C, panel izquierdo)**. Quisimos evaluar el efecto que la retirada de EGF ejerce sobre la parada en G1, observando una fuerte correlación entre la parada en G1 y la resistencia de las células privadas de EGF a TRAIL **(Figura 14C, panel derecho)**. Esto sugiere que la activación constitutiva de ErbB2, y por tanto de las rutas situadas aguas debajo de la misma PI3K/AKT, MAPK/ERK entre otras, podrían estar regulando la parada en el ciclo y con ello la sensibilidad de las células a TRAIL.

Generalmente, cuando ensayamos la sensibilidad de diferentes líneas celulares a distintos agentes siempre lo hacemos mediante cultivos celulares en monocapa o 2D que crecen en plástico, sin embargo, con este sistema no se tiene en cuenta la estructura glandular del epitelio in vivo y por tanto no trabajamos con un sistema óptimo que nos vaya a permitir comprender la influencia de estas estructuras en procesos tales como la regulación de la proliferación o de la muerte celular.

Uno de los sistemas que permite el estudio de la morfogénesis del epitelio glandular in vitro es el cultivo de células epiteliales en 3 dimensiones (3D). Con este sistema, podemos simular muchas de las características típicas del epitelio de mama in vivo: formación de acinos con el lumen vacío y polarización apicobasal de las células que componen estos acinos, entre otros (Debnath et al. 2003; Bissel & Radisky 2001). Por ello, decidimos estudiar en un sistema 3D, cuál era la sensibilidad a TRAIL del modelo MCF10A pBabe/pNeuN/pNeuT.

Los resultados obtenidos mostraron que existía una sensibilidad a TRAIL diferente entre las 3 líneas. Al igual que ocurre en 2D, las células pNeuT son las más sensibles a la muerte inducida por TRAIL, sin embargo, debido a su crecimiento en forma de estructuras complejas invasivas, no pudo realizarse una cuantificación objetiva de la muerte celular. Por otro lado y a diferencia de lo que ocurría en 2D,

sí que se observa un incremento significativo de la sensibilidad a TRAIL en células pNeuN en comparación con pBabe (**Figura 15**), lo cual sugeriría una regulación diferencial de la apoptosis inducida por TRAIL en células que sobreexpresan el oncogén ErbB2.

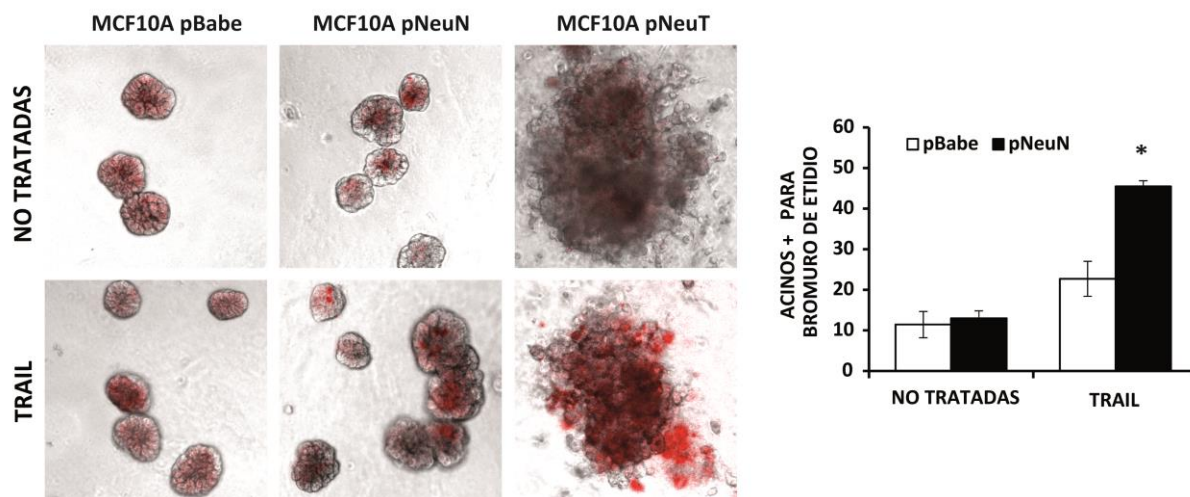


Figura 15 | Sensibilidad a TRAIL de células MCF10A transformadas con una forma constitutivamente activa del oncogén ErbB2/Her2 en cultivos tridimensionales (panel izquierdo) Imágenes representativas de microscopía óptica con lámpara de mercurio. Células MCF10A pBabe/pNeuN/pNeuT se utilizaron para ensayos de morfogénesis en 3D tal y como se detalla en materiales y métodos. A día 12 de crecimiento, las células se trataron con TRAIL a 100ng/ml durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo las células se tiñeron con una solución de bromuro de etidio (EtBr) tal y como se detalla en materiales y métodos. **(panel derecho)** La gráfica muestra el porcentaje de acinos con más de dos células teñidas por EtBr. Los datos mostrados son la media de tres experimentos diferentes. * $p < 0,05$, ** $p > 0,01$, *** $p < 0,001$. En cada experimento se analizaron al menos 100 acinos.

2.3 El estado mesenquimal de las células epiteliales de mama no está relacionado con la sensibilidad de las células a TRAIL.

Se ha establecido una relación entre la pérdida de CD24 y la entrada en transición epitelio-mesénquima (EMT) (Morel et al. 2008). Esto junto con los cambios morfológicos observados en las células MCF10A pNeuT (**Figura 12A**), nos condujo a analizar si la activación constitutiva del receptor de ErbB2 podría estar induciendo EMT, proceso morfogenético en el que las células pierden sus características epiteliales y adquieren propiedades mesenquimales.

Para ello, analizamos los niveles de expresión de marcadores epiteliales y mesenquimales en las 3 líneas. A diferencia de lo que ocurre para las células pBabe/pNeuN, las células pNeuT expresan bajos niveles de marcadores epiteliales (E-caderina, Ocludina y β -catenina) y altos niveles de marcadores mesenquimales (Vimentina y Fibronectina) (**Figura 16A, panel izquierdo y 16C**). De igual manera, estudiamos la expresión de factores de transcripción inductores de EMT y observamos como las

células pNeuT expresan niveles de proteína mayores de Twist, Zeb1 y Snail que las líneas pBabe y pNeuN. Lo mismo ocurría a nivel de RNA mensajero (**Figura 16A, panel derecho y 16B**).

De este modo podemos decir que la transformación de células normales epiteliales de mama con una forma mutada y constitutivamente activa de ErbB2(Neu)/Her2 provoca la inducción del proceso de transición epitelio mesénquima lo que promueve la aparición de un fenotipo mesenquimal, la adquisición de propiedades tumorigénicas y características de célula madre propias de una línea tumoral.

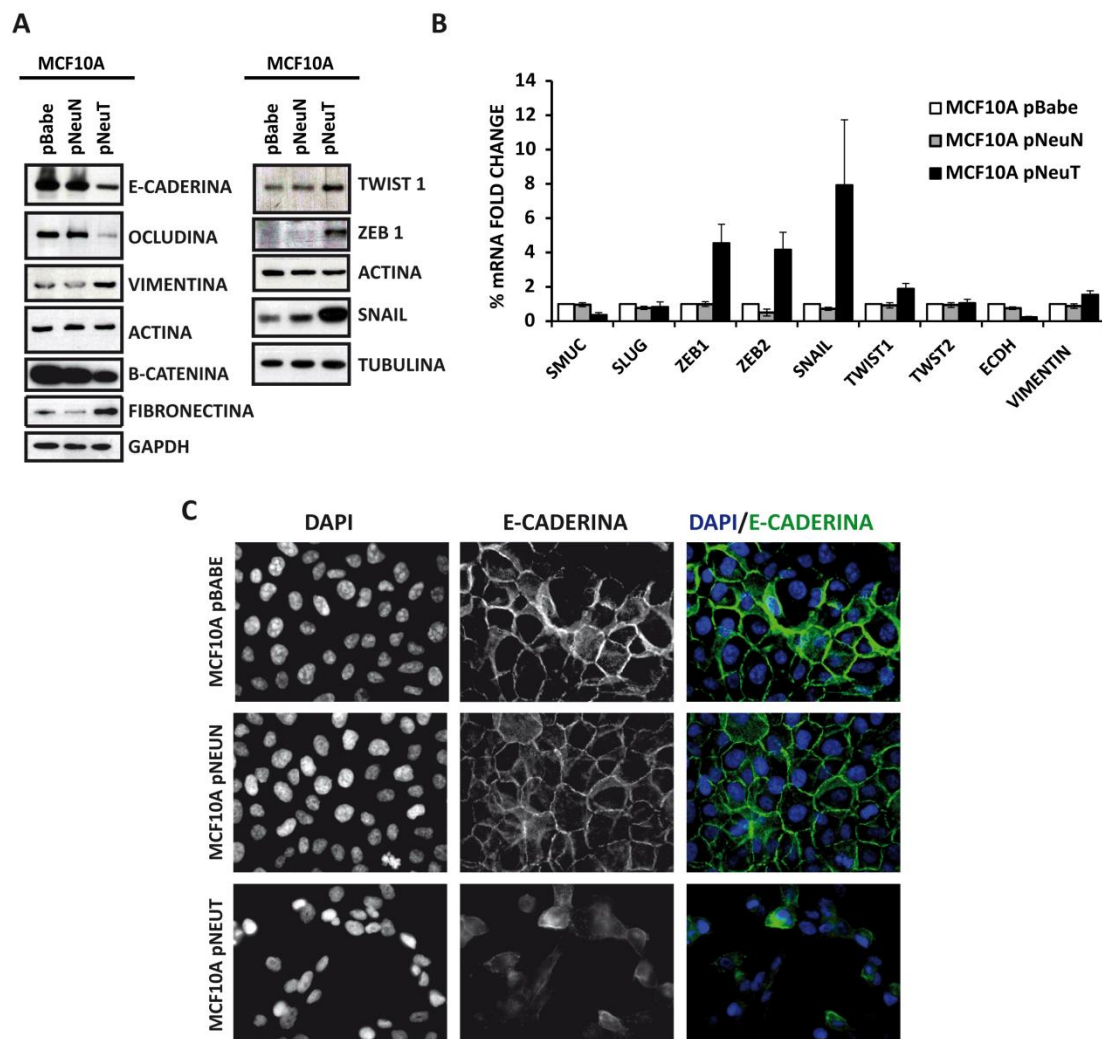


Figura 16 | Sobreexpresión en células MCF10A de una forma constitutivamente activa del oncogén ErbB2/Her2 induce la adquisición de un fenotipo mesenquimal. (A) La expresión basal de los marcadores de EMT: E-caderina, ocludina, Vimentina, β -catenina, Fibronectina, y de los EMT-TFs: Twist, Zeb1 y Snail en células MCF10A pBabe/pNeuN/pNeuT se analizaron mediante western-blot. Los niveles de GAPDH y Tubulina se emplearon como control de carga. Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes **(B)** Los niveles de expresión basales de Smuc, Slug, Zeb1, Zeb2, Snail, Twist1, Twist2, E-caderina (ECDH) y Vimentina se analizaron mediante RT-QPCR. Los datos mostrados son la media de tres experimentos independientes **(C)** Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia de células MCF10A pBabe/pNeuN/pNeuT que fueron fijadas y teñidas con anticuerpos anti-E-caderina. Los núcleos se tiñeron con DAPI.

Una vez analizada la respuesta a TRAIL y el fenotipo del modelo MCF10A pBabe/pNeuN/pNeuT, quisimos profundizar en el mecanismo responsable de la mayor sensibilidad a TRAIL de las células pNeuT. Con este propósito, y dado que una de las consecuencias de la activación constitutiva del receptor de ErbB2 en células epiteliales de mama, es la inducción de un estado mesenquimal, decidimos evaluar el papel de la transición epitelio mesénquima (EMT) en la apoptosis inducida por TRAIL. Debido a la evidente activación del factor de transcripción Snail en células pNeuT con respecto a las células pBabe y pNeuN (**Figura 16A-B**), analizamos el papel de éste en la muerte inducida por TRAIL así como en el estado mesenquimal de las células pNeuT.

Para ello realizamos el silenciamiento mediante ARN de transferencia del factor de transcripción Snail. Sin embargo, a pesar del correcto silenciamiento de éste, no observamos cambios significativos ni en la morfología celular ni en la sensibilidad de las células a TRAIL (**Figura 17**).

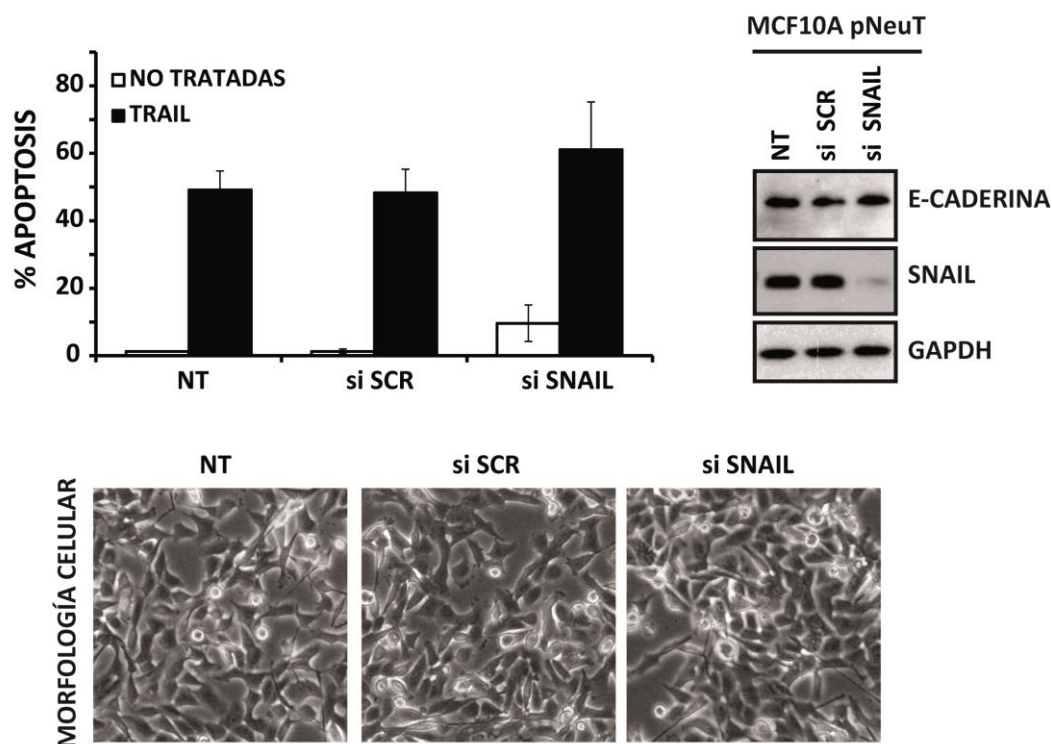


Figura 17 | El EMT-TFs Snail no está implicado en la mayor sensibilidad de las células MCF10A p NeuT a la apoptosis inducida por TRAIL. (A) (panel superior) Células MCF10A pNeuT se transfectaron con el oligo de RNA de interferencia frente a Snail, el oligo scrambled (SCR) o no transfectadas (NT) a una concentración de 50nM durante 30 horas tal y como se especifica en materiales y métodos. Transcurrido ese tiempo las células fueron tratadas o no con TRAIL a 100ng/ml durante 24 horas. La apoptosis se midió como el porcentaje de células en subG1 por citometría de flujo tal y como se describe en materiales y métodos. Los histogramas muestran los valores \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. Los niveles de expresión de E-caderina y Snail se analizaron mediante western-blot. Los niveles de GAPDH se emplearon como control de carga. **(panel inferior)** Imágenes representativas de microscopía de contraste de fases que muestran la morfología celular de las células MCF10A pNeuT transfectadas.

Por otro lado, se había descrito una posible relación entre la señalización de TRAIL y la transición epitelio-mesénquima (Grosse-Wilde et al. 2008; Rahman et al. 2009), lo que nos condujo a analizar cómo sería la respuesta al ligando de muerte TRAIL en un modelo de transición epitelio-mesénquima previamente descrito (Morel et al. 2012), en colaboración con este laboratorio.

El modelo que empleamos fue generado a partir de la línea epitelial de mama inmortalizada HMEC-hTERT (HHZ), transformada con el oncogén RAS (HHZ-RAS) o con el oncogén RAS y un inductor clásico de EMT: Zeb1, Zeb2, Twist1 (HHZ-RAS-ZEB1, HHZ-RAS-ZEB2, HHZ-RAS-TWIST1E12, respectivamente) **(Figura 18B, panel superior)**. Además, basados en datos previos de este laboratorio en los que se muestra que Twist y Zeb1 pueden inhibir funcionalmente a p53 previniendo la entrada en senescencia y la apoptosis, se generaron otros modelos de EMT mediante silenciamiento estable de la expresión de p53 en HMEC y posterior sobreexpresión del oncogén RAS e inmortalización de las células con la proteína hTERT, generando la línea celular denominada HMEC-hTERT-shp53-RAS **(Figura 18B, panel superior)**. La caracterización de estas células permitió observar la aparición espontánea de células con características mesenquimales resultado de la activación del proceso de EMT que coexistían en el mismo cultivo con células de características y morfología epiteliales. La separación de las poblaciones epiteliales y mesenquimales mediante citometría de flujo en base a sus fenotipos antigénicos diferenciales (EpCAM+ y EpCAM- respectivamente) proporcionó las líneas denominadas como HHZ-shp53-RAS EPI y HHZ-shp53-RAS MES.

El análisis de la morfología de las células que constituyen este modelo, nos muestra como las células HHZ, HHZ-RAS y HHZ-shp53-RAS EPI presentan una morfología tipo adoquinado característica de células epiteliales, que se corresponde con una baja expresión de marcadores mesenquimales (vimentina y N-caderina) y una alta expresión de marcadores epiteliales (E-caderina y ocludina). En el otro extremo, se encuentran las células HHZ-RAS-ZEB1 y HHZ-shp53-RAS MES que exhiben una morfología alargada tipo fibroblástica propia de un fenotipo mesenquimal y que se corresponde con altos niveles de expresión de vimentina y una pérdida de expresión de E-caderina y ocludina. Por otro lado, dispusimos también de las líneas celulares HHZ-RAS-ZEB2 y HHZ-RAS-TWIST que presentan un fenotipo intermedio, manteniendo el nivel de expresión de E-caderina así como la morfología característica epitelial **(Figura 18A-B)**.

En estos diferentes modelos de EMT analizamos la respuesta a TRAIL y observamos que las células con características mesenquimales (línea roja) son significativamente más resistentes a TRAIL que las células con un fenotipo intermedio y epitelial (línea verde y azul respectivamente), a excepción de lo que ocurre con las células MCF10A pNeuT que a pesar de su estado mesenquimal son extremadamente sensibles a TRAIL **(Figura 18C-D)**.

Según todos estos datos podemos concluir que la mayor sensibilización a TRAIL de las células MCF10A pNeuT que sobreexpresan una forma constitutivamente activa del receptor ErbB2, no está asociada al estado mesenquimal que presentan sino, probablemente, a otros cambios fenotípicos ocasionados por la transformación tumoral por este oncogén que estos momentos desconocemos.

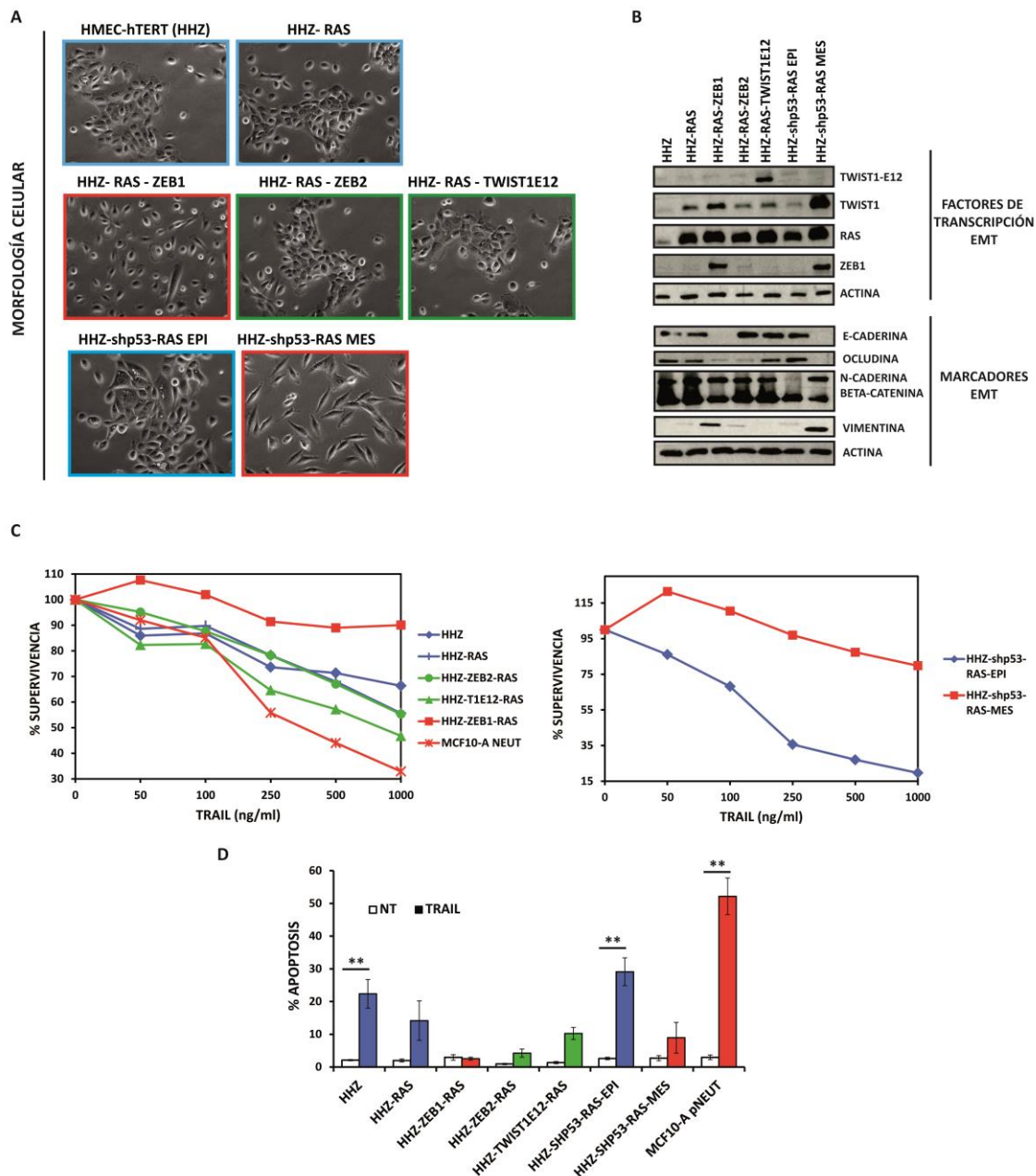


Figura 18 | Sensibilidad a TRAIL del modelo celular de EMT generado a partir de la línea HMEC-hTERT. (A) Imágenes representativas obtenidas por microscopía de contraste de fases de células HMEC-hTERT (HHZ), HHZ-RAS, HHZ-RAS-ZEB1, HHZ-RAS-ZEB2, HHZ-RAS-TWIST1E12, HHZ-shp53-RAS EPI y HHZ-shp53-RAS MES. **(B)** Los niveles de expresión basales de Twist, RAS, Zeb1, E-caderina, Ocludina, N-caderina, β -catenina y Vimentina se analizaron mediante western-blot. Los niveles de Actina se emplearon como control de carga. Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes. **(C) (panel izquierdo)** Las células HMEC-hTERT (HHZ), HHZ-RAS, HHZ-RAS-ZEB1, HHZ-RAS-ZEB2, HHZ-RAS-TWIST1E12 y **(panel derecho)** HHZ-shp53-RAS EPI y HHZ-shp53-RAS MES se trataron con las dosis indicadas de TRAIL durante 48 horas. La supervivencia celular se midió mediante tinción con cristal violeta tal y como se detalla en materiales y

métodos. Los datos mostrados son la media de dos experimentos independientes. **(D)** Las células HMEC-hTERT (HHZ), HHZ-RAS, HHZ-RAS-ZEB1, HHZ-RAS-ZEB2, HHZ-RAS-TWIST1E12, HHZ-shp53-RAS EPI y HHZ-shp53-RAS MES, se trataron con TRAIL a 100ng/ml durante 48 horas. La apoptosis se midió como el porcentaje de células en subG1 por citometría de flujo tal y como se describe en materiales y métodos. Los histogramas muestran los valores \pm SEM de 5 experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p > 0,01$, *** $p < 0,001$.

2.4 La activación de las rutas de MAPK/ERK, PI3K/AKT y mTOR favorece la apoptosis inducida por TRAIL en células no tumorales MCF10A.

Dado que el estado mesenquimal no parece mantener ninguna relación con la sensibilidad diferencial a TRAIL de las células de mama MCF10A pBabe/pNeuN/pNeuT, el siguiente paso lo dirigimos a estudiar el papel de las rutas de señalización que se encuentran desreguladas como consecuencia de la activación constitutiva del receptor de ErbB2: La ruta de MAPK/ERK, la ruta de PI3K/AKT y la ruta de mTOR.

Para evaluar la implicación de cada una de estas rutas en la mayor sensibilidad de las células pNeuT a TRAIL, empleamos inhibidores específicos de cada una de estas rutas: U0126, GSK690963 y Torina1, que ya han sido anteriormente ensayados en nuestro laboratorio (Martín-Pérez et al. 2014; Yerbes et al. 2012).

De acuerdo con los resultados descritos en el capítulo anterior (**Figura 3A**), el tratamiento simultáneo con TRAIL y los inhibidores específicos de las rutas de MAPK/ERK y PI3K/AKT de las tres líneas derivadas de las MCF10A, aumenta significativamente la apoptosis inducida por TRAIL. Sin embargo, tratamientos similares con un inhibidor de la ruta de mTOR no ejerce ningún efecto sobre la apoptosis inducida por TRAIL en estas células (**Figura 19A**).

En cambio, al inhibir individualmente cada una de estas rutas de señalización previo al tratamiento con TRAIL, pudimos observar un incremento de la resistencias de estas líneas celulares a la acción de TRAIL, lo que podría estar en parte relacionado con el aumento que se produce sobre los niveles de la proteína inhibidora FLIP(L) (**Figura 19B**).

Finalmente y para confirmar la implicación del receptor de ErbB2 en la mayor sensibilidad de las células pNeuT al ligando de muerte TRAIL, empleamos el inhibidor de la actividad tirosín quinasa de ErbB2 Lapatinib. Debido a los diferentes efectos observados al inhibir las distintas rutas activadas por ErbB2 simultáneamente o con anterioridad al tratamiento con TRAIL, decidimos evaluar el efecto de la inhibición del receptor de ErbB2 siguiendo ambos procedimientos.

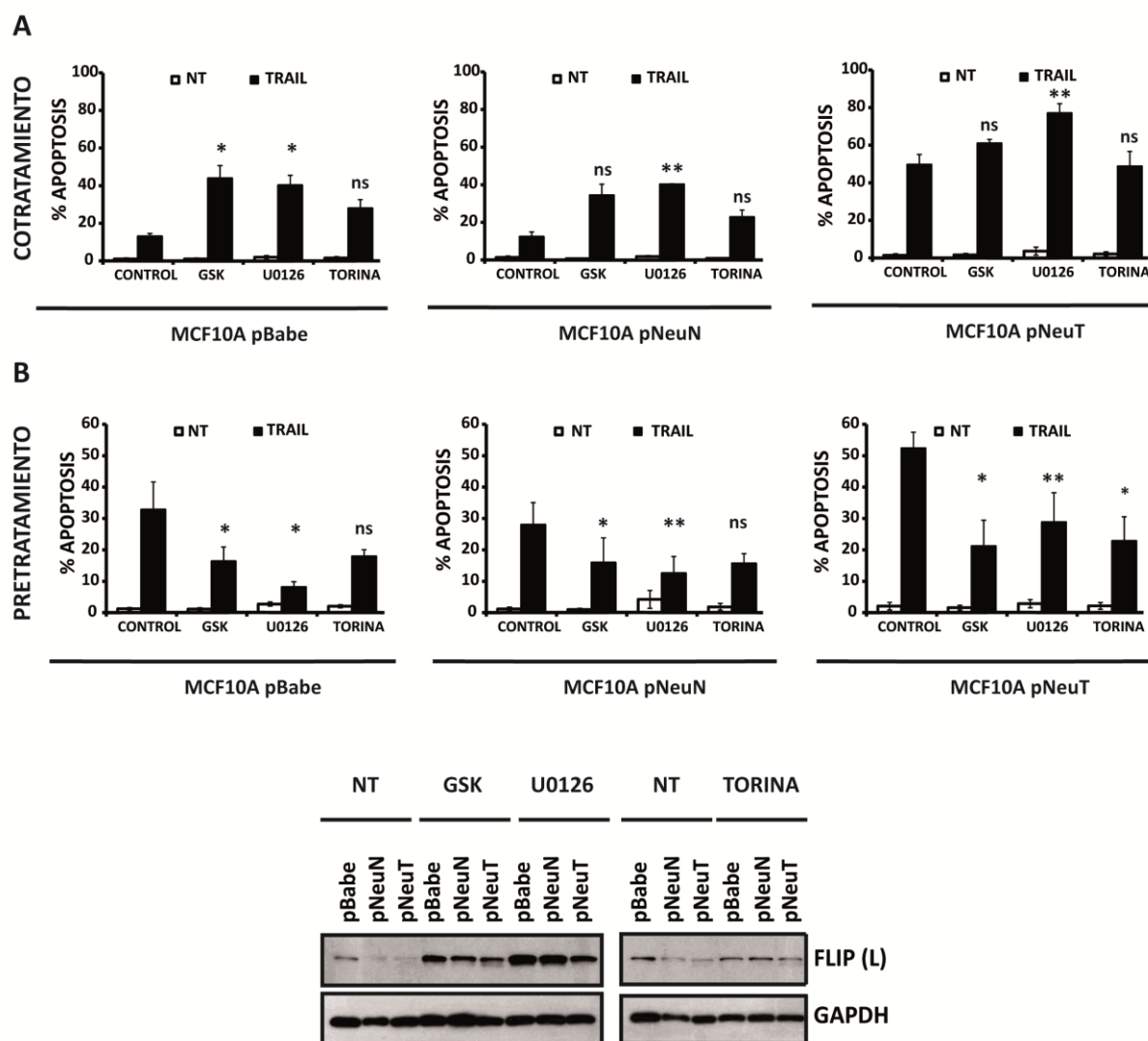


Figura 19 | Efecto sobre la sensibilidad a TRAIL de la inhibición de las rutas de MAPK/ERK y PI3K/AKT y mTOR en el modelo celular de células MCF10A que sobreexpresan formas normales (wt) o constitutivamente activas del oncogen **ErbB2/Her2/Neu** (A) Células MCF10A pBabe/pNeuN/pNeuT se trataron o no con los inhibidores GSK690963 (10uM), U0126 (10uM) y Torina (250nM) en combinación con TRAIL a 100 ng/ml durante 24 horas. (B) Células MCF10A pBabe/pNeuN/pNeuT se trataron o no con los inhibidores GSK690963 (10uM), U0126 (10uM) Torina (250nM) durante 15 horas, tras la cuales las células se trataron con TRAIL a 100ng/ml durante 24 horas. La apoptosis se midió como el porcentaje de células en subG1 por citometría de flujo tal y como se describe en materiales y métodos. Los histogramas muestran los valores +/- SEM de al menos 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Los niveles de expresión FLIP se analizaron mediante western-blot. Los niveles de GAPDH se emplearon como control de carga.

Observamos de este modo como de acuerdo con lo descrito previamente, el tratamiento simultáneo con lapatinib y TRAIL potencia la apoptosis inducida por TRAIL (**Figura 20A**), mientras que un pretratamiento de 15 horas antes de la adicción de TRAIL, bloquea casi totalmente la muerte. Este bloqueo de la apoptosis va acompañado de un incremento en los niveles celulares de FLIP(L), sugiriendo que esta mayor sensibilidad de las células MCF10A pNeuT a TRAIL es resultado de la activación constitutiva de ErbB2 en estas células (**Figura 20B-C**).

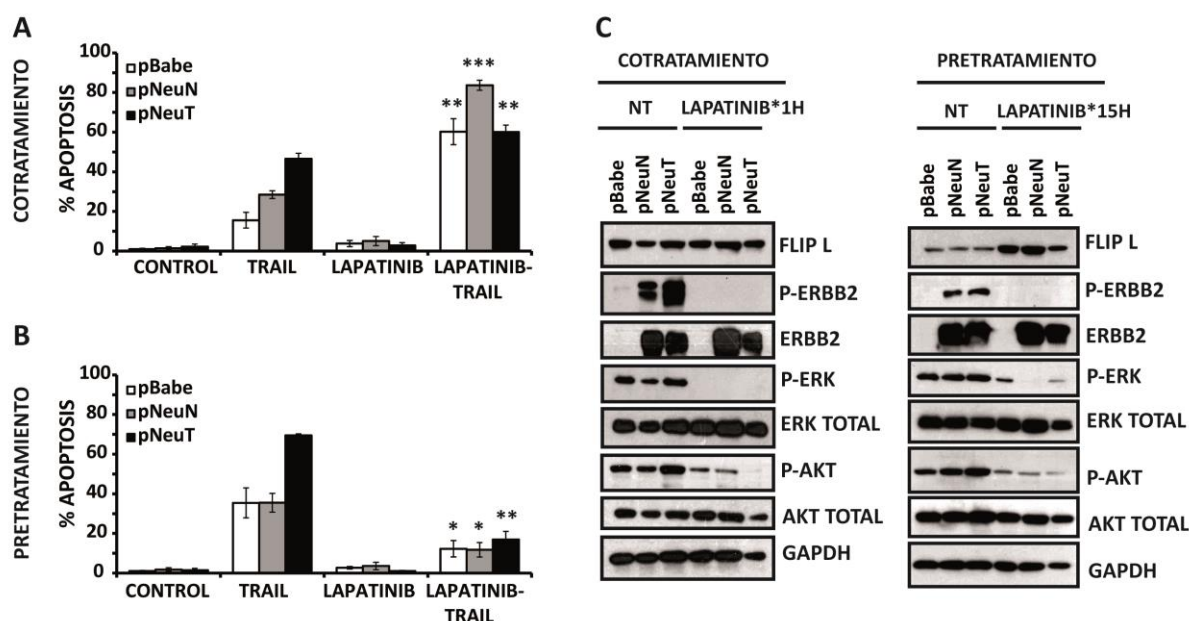


Figura 20 | Efecto sobre la sensibilidad a TRAIL de la inhibición del receptor de ErbB2 en el modelo celular de células MCF10A que sobreexpresan formas normales (wt) o constitutivamente activas del oncogen ErbB2/Her2/Neu (A) Células MCF10A pBabe/pNeuN/pNeuT se trataron o no con Lapatinib (5 μ M) en combinación con TRAIL a 100 ng/ml durante 24 horas. (B) Células MCF10A pBabe/pNeuN/pNeuT se trataron o no con Lapatinib (5 μ M) durante 15 horas, tras las cuales las células se trataron con TRAIL a 100ng/ml durante 24 horas. La apoptosis se midió como el porcentaje de células en subG1 por citometría de flujo tal y como se describe en materiales y métodos. Los histogramas muestran los valores \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. (C) Los niveles de expresión FLIP, p-ErbB2 (Tyr1248), ErbB2, p-ERK, ERK, p-AKT y AKT se analizaron mediante western-blot. Los niveles de GAPDH se emplearon como control de carga. Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes.

2.5 Las células epiteliales de mama que sobreexpresan el oncogen p95HER2 son más sensibles a la apoptosis inducida por TRAIL.

Para profundizar en el estudio del papel del oncogén ErbB2 en la sensibilidad de células epiteliales de mama a TRAIL, decidimos emplear otro modelo tumoral/no tumoral que habíamos generado en el laboratorio y que consiste en la transformación de la línea epitelial de mama MCF10A con la forma completa del oncogen HER2 humano cuya sobreexpresión en pacientes con cáncer de mama se encuentra asociado a un peor pronóstico, o con una forma truncada de ErbB2/HER2 conocida como 100-115 KDa p95HER2. Lo que denominamos como p95 HER2, son fragmentos HER2 truncados que han perdido su dominio extracelular pero que mantienen su actividad tirosín quinasa y que se encuentran frecuentemente sobreexpresados en líneas celulares y tumores de cáncer de mama HER2 positivos (Scaltriti et al. 2007). Uno de estos fragmentos, denominado 100-115 kDa p95HER2 o 611-CTF, es hiperactivo debido a su habilidad para formar homodímeros y a pesar de haber perdido la mayor parte de su dominio extracelular, este fragmento de HER2 favorece la progresión del cáncer de mama in vivo (Gagliato et al. 2016; Arribas et al. 2011).

Las líneas estables generadas las denominaremos MCF10A/mock a la generada con el vector vacío, MCF10A/wtHER2, a la generada con la forma completa del oncogen ErbB2/Her2 y MCF10A/p95HER2 a aquella que sobreexpresa una forma truncada y constitutivamente activa del oncogén HER2.

Una vez establecido el modelo, el siguiente paso fue evaluar cuál era la sensibilidad al ligando de muerte TRAIL en el modelo MCF10A mock/wt HER2/p95 HER2, y si existía alguna diferencia entre las 3 líneas. Observamos como las células p95HER2 son significativamente más sensibles al tratamiento con diferentes dosis de TRAIL recombinante que las línea mock y wtHER2. En este modelo, la línea celular wtHER2 también es significativamente más sensibles que las mock a dosis altas de TRAIL (**Figura 21A**).

Al igual que con el modelo anterior y con el objetivo de profundizar en el mecanismo responsable de esta sensibilidad diferencial, analizamos los niveles basales de proteínas del DISC. No se apreciaron cambios a nivel de proteína de Caspasa 8, FLIP (L), FLIP(S) o FADD. Sin embargo, observamos un aumento en los niveles de TRAIL-R2/DR5 tanto en las células wtHer2 como en las p95Her2, siendo aún mayores en estas últimas (**Figura 21B, panel izquierdo**). A partir de este resultado nos planteamos investigar si este aumento a nivel de proteína total, se reflejaba también en los niveles de este receptor de TRAIL en la superficie celular. Para ello realizamos un análisis de expresión de TRAIL-R2/DR5 en la superficie celular el cuál mostró los mismos resultados observados a nivel de proteína total. Las tres líneas celulares expresaban altos niveles de receptor en la membrana, observándose una inducción en los niveles de TRAIL-R2/DR5 en las células wtHER2 que es aún mayor en el caso de las células p95Her2 (**Figura 21B, panel derecho**). Estos resultados apuntan a que el aumento de expresión de TRAIL-R2/DR5 podría ser el mecanismo por el cual las células que sobreexpresan la forma completa o truncada del oncogén HER2 presentan una mayor sensibilidad a TRAIL.

Con la intención de caracterizar este modelo y al igual que hicimos con el modelo MCF10A pBabe/pNeuN/pNeuT, estudiamos cuál sería la sensibilidad de estas líneas celulares a la privación de EGF. De nuevo observamos que las células mock y wtHER2, en ausencia de EGF se hacen resistentes a TRAIL mientras que las células p95HER2 se ven mínimamente afectadas (**Figura 21C, panel izquierdo**).

Evaluamos el efecto que la retirada de EGF ejercía sobre la parada en G1, observando igualmente una correlación directa entre los niveles de parada en G1 y la resistencia a TRAIL de las células privadas de EGF (**Figura 21C, panel derecho**).

Además, comprobamos como la retirada prolongada de EGF, provoca un aumento en los niveles de proteína de FLIP en células mock y wtHER2, mientras que células que sobreexpresan la forma truncada e hiperactiva de HER2, mantienen sin cambios los niveles de FLIP(L) en respuesta a la privación de EGF. Estos datos corroboraron los demostrados previamente por el grupo con el anterior modelo (Yerbes et al. 2012).

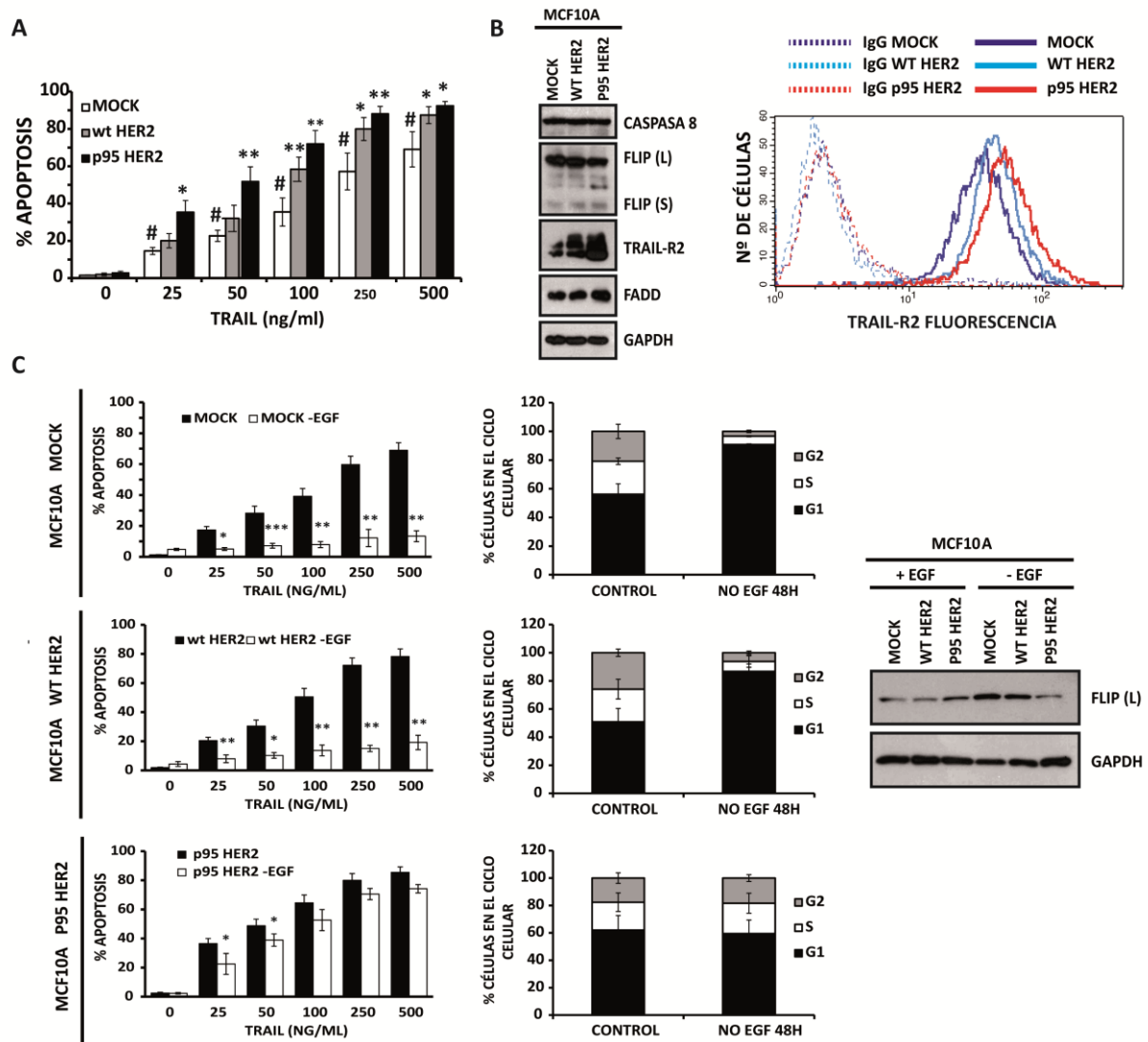


Figura 21 | Sobreexpresión de p95Her2/611CTF en células humanas epiteliales de mama MCF10A incrementa la sensibilidad de las células a TRAIL. (A) Células MCF10A mock/wtHER2/p95HER2 se trataron con las dosis indicadas de TRAIL durante 24 horas. La apoptosis se midió tras los tratamientos como el porcentaje de células en subG1 por citometría de flujo tal y como se describe en materiales y métodos. Los histogramas muestran los valores +/-SEM de al menos 3 experimentos independientes. Las $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. (B) (panel izquierda) Los niveles basales de Caspasa-8, FLIP, FADD y TRAIL-R2 fueron analizados por western blot. Las proteínas GAPDH se emplearon como control de carga. (panel derecha) La expresión en la superficie celular de TRAIL-R2 fue analizada por citometría de flujo con el anticuerpo específico TRAIL-R2-PE tal y como se describe en materiales y métodos. Células incubadas con la inmunoglobulina IgG-PE se emplearon como control de fluorescencia basal. Los datos mostrados son representativos de 3 experimentos independientes. (C) (panel izquierdo) Células MCF10A mock/wtHER2/p95HER2 crecieron en presencia o en ausencia de

20ng/ml de EGF durante 48 horas, tiempo tras el cual se trataron o no con las dosis indicadas de TRAIL durante 24 horas. La apoptosis se midió como el porcentaje de células en subG1 por citometría de flujo tal y como se describe en materiales y métodos. Los histogramas muestran los valores \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p > 0,01$, *** $p < 0,001$. **(panel derecho)** Células MCF10A mock/wtHER2/p95HER2 crecieron en presencia o en ausencia de 20ng/ml de EGF durante 48 horas. El porcentaje de células en cada fase del ciclo celular se realizó mediante citometría de flujo tal y como se detalla en materiales y métodos y se analizó mediante el software (nombre del programa de análisis del ciclo). Los niveles basales de FLIP fueron analizados por western blot. Las proteínas GAPDH se emplearon como control de carga. Los datos mostrados con la media de dos experimentos independientes.

CAPITULO III: Estudio de la función reguladora del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento transformante (TGF- β) en la señalización de apoptosis por TRAIL.

3.1 TGF- β inhibe la sensibilización mediada por EGF de células no tumorales epiteliales de mama a la apoptosis inducida por TRAIL.

En los últimos años se ha descrito un importante papel del sistema TRAIL en la regulación de la morfogénesis mamaria. Los niveles de TRAIL incrementan durante la morfogénesis de células humanas epiteliales de mama MCF10A en cultivos tridimensionales, sin embargo este evento no está dirigido exclusivamente a la inducción de apoptosis sino que media la inducción de un proceso autofágico paralelo a la apoptosis, ambos necesarios para la formación del lumen (Mills et al. 2004). Además nuestro grupo ha descrito el mecanismo por el que TRAIL induce autofagia en MCF10A y el papel de FLIP en la regulación de la señalización apoptótica de TRAIL y en la morfogénesis de células epiteliales de mama (Herrero-Martín et al. 2009; Yerbes et al. 2011), así como el papel modulador en la apoptosis inducida por TRAIL del factor de crecimiento epidérmico (EGF) en células humanas epiteliales de mama no transformadas (Yerbes et al. 2012). Debido a que TGF- β participa en el proceso de desarrollo mamario a través de la regulación de la proliferación epitelial y la apoptosis (Moses & Barcellos-hoff 2010), quisimos estudiar la relación entre TGF- β y EGF en la regulación de la señalización temprana inducida por TRAIL y en la apoptosis.

Tal y como hemos mencionado en capítulos anteriores, datos previos del grupo demuestran que la ausencia de EGF provoca una mayor resistencia de células epiteliales de mama al tratamiento con TRAIL. Además, la readicción de EGF a células privadas del mismo, permite recuperar la sensibilidad de las células a TRAIL (Yerbes et al. 2012) (**Figura 22A**). Siguiendo este mismo protocolo, estudiamos el efecto de TGF- β en la sensibilización a TRAIL inducida por EGF en células epiteliales de mama MCF10A. La figura 19A muestra como TGF- β inhibe significativamente la sensibilización a TRAIL inducida por la readicción de EGF a cultivos celulares privados de EGF. Además observamos como la inhibición por TGF- β de la apoptosis inducida por TRAIL en células MCF10A es dependiente de la concentración de TGF- β , siendo la dosis de 5 ng/ml la de mayor efecto (**Figura 22B, panel izquierdo**). Igualmente, quisimos evaluar si TGF- β estaba actuando a través de la activación del receptor 1 (TGF β R1) Para ello empleamos el inhibidor SB431542 que bloquea la activación de este receptor y observamos como la inhibición por TGF- β de la apoptosis inducida por TRAIL requiere la activación de TGF β R1 (**Figura 22B, panel derecho**).

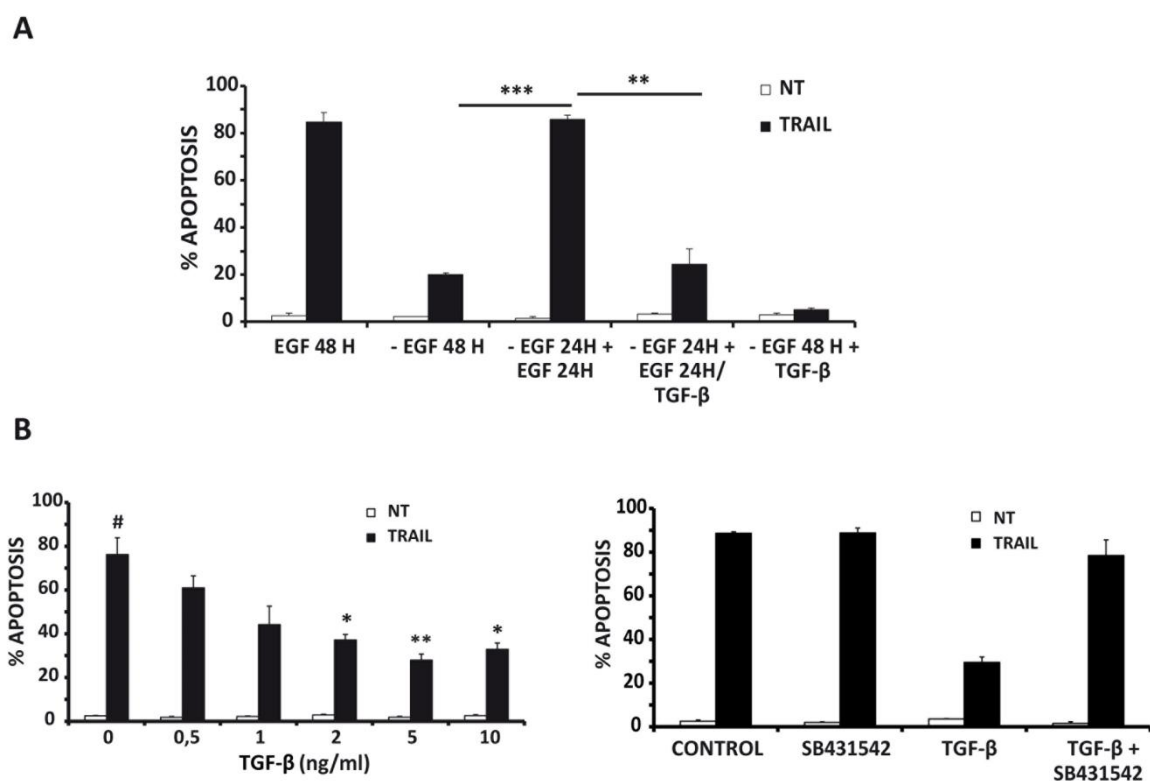


Figura 22 | TGF-β inhibe la sensibilización a la apoptosis inducida por TRAIL mediada por EGF en células humanas no tumorales epiteliales de mama. (A) Células MCF10A cultivadas en presencia o en ausencia de EGF (20ng/ml) durante 48 horas, tras las cuales fueron tratadas con TRAIL 250ng/ml durante 24 horas. Otros cultivos de células MCF10A se crecieron en presencia o en ausencia de EGF durante 24 horas, transcurrido este tiempo se añadió EGF (20ng/ml) o EGF (20ng/ml) y TGFβ (5ng/ml) durante 24 horas, tras las cuales fueron tratadas con TRAIL 250ng/ml durante 24 horas. La apoptosis se midió como el porcentaje de células en subG1 por citometría de flujo, tal y como se describe en materiales y métodos. Los histogramas muestran los valores +/- SEM de 3 experimentos independientes. *p<0,05, **p>0,01, ***p<0,001. **(B) (panel izquierdo)** Células MCF10A cultivadas en medio con EGF(20ng/ml) y se trataron con las dosis indicadas de TGFβ (0.5-10ng/ml) durante 24 horas, tras las cuales las células se trataron con o sin TRAIL (250ng/ml) durante 24 horas. **(Panel derecho)** Células MCF10A se cultivadas en medio con EGF(20ng/ml) se trataron con el inhibidor de TGFβR1: SB431542 (0,2μM) y TGFβ (5ng/ml) durante 24 horas, tras las cuales las células se trataron con o sin TRAIL (250ng/ml) durante 24 horas más. La apoptosis se midió como el porcentaje de células en subG1 por citometría de flujo, tal y como se describe en materiales y métodos. Los histogramas muestran (panel izquierda) los valores +/- SEM de 3 experimentos independientes. *p<0,05, **p>0,01, ***p<0,001 y (panel derecho) la media de dos experimentos independientes.

Para demostrar que la inhibición por TGF-β de la apoptosis inducida por TRAIL no se trata de una respuesta específica de esta línea celular sino que representa un mecanismo general quisimos evaluar el efecto de TGF-β en otros modelos de células no tumorales epiteliales de mama dependientes de EGF, observando en células MCF12A y HMEC una inhibición mediada por TGF-β de la apoptosis inducida por TRAIL (**Figura 23A**). Sin embargo, este efecto no se observó en líneas celulares tumorales MDAMB-231 y HeLa (**Figura 23B**), lo que sugiere una regulación diferencial de la apoptosis inducida por TRAIL en líneas tumorales y no tumorales.

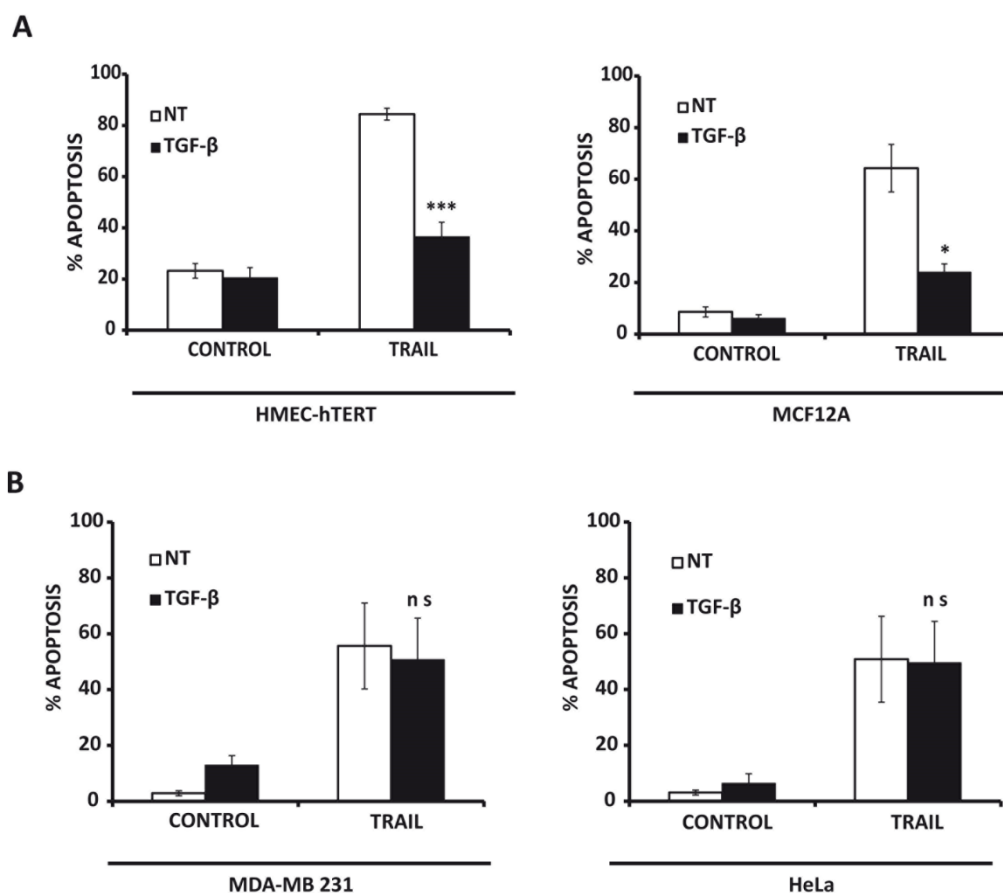


Figura 23 | TGF-β inhibe la sensibilización a la apoptosis inducida por TRAIL mediada por EGF únicamente en células humanas epiteliales de mama. (A) (panel izquierdo) Células epiteliales de mama HMEC-hTERT y **(panel derecho)** MCF12A se trataron con o sin TGFβ (5ng/ml) durante 24 horas, tras las cuales fueron tratadas con TRAIL (1000 ng/ml) durante 48 o 72 horas respectivamente. **(B) (panel izquierdo)** Células tumorales de mama MDA-MB231 y **(panel derecho)** células tumorales HeLa se incubaron con o sin TGFβ (5ng/ml) durante 24 horas, tras las cuales fueron tratadas con TRAIL (500 ng/ml) durante 70 o 24 horas respectivamente. La apoptosis se midió como el porcentaje de células en subG1 por citometría de flujo, tal y como se describe en materiales y métodos. Los histogramas muestran los valores +/- SEM de 3 experimentos independientes. ns: no significativo, * $p < 0,05$, ** $p > 0,01$, *** $p < 0,001$.

En células epiteliales de mama no tumorales la resistencia de las células a TRAIL inducida por retirada de EGF o por tratamiento con gefitinib, inhibidor específico del receptor tirosín quinasa de EGF (EGFR), se encuentra mediada por la inactivación de la ruta de MAPK/ERK que induce un aumento en los niveles de FLIP(L) (Yerbes et al. 2012). Para comprobar si la resistencia a TRAIL inducida por TGF-β implica un mecanismo similar, determinamos los niveles de FLIP y de fosforilación de ERK en células MCF10A tratadas con TGF-β durante 24 horas. Sin embargo y en contraste a lo que ocurre con la retirada de EGF, el tratamiento con TGF-β provoca una activación de la ruta de MAPK/ERK, tal y como se ha descrito (Lee et al. 2007), y no se observan cambios en los niveles de FLIP (**Figura 24**). Todo esto sugiere que el efecto antagónico que tiene TGF-β en la sensibilización mediada por EGF a la apoptosis inducida por TRAIL no se debe a la inhibición de la señalización del EGFR.

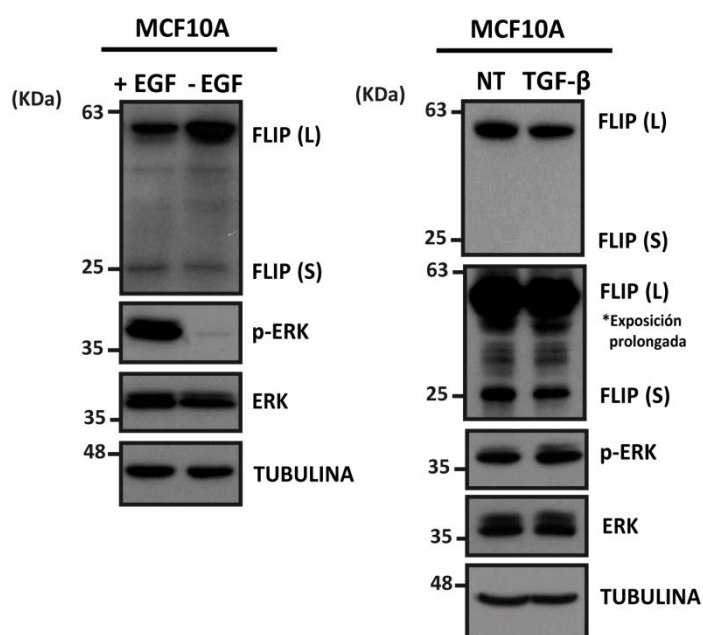


Figura 24 | El tratamiento con TGF- β no afecta a los componentes del DISC de TRAIL. (Panel izquierdo) Células MCF10A cultivadas en ausencia o en presencia de EGF (20ng/ml) durante 48 horas o (panel derecho) tratadas con TGF β (5ng/ml) durante 24 horas en presencia de EGF. Los niveles de expresión de FLIP, p-ERK, ERK se analizaron en extractos celulares totales por western-blot tal y como se detalla en materiales y métodos. La Tubulina se empleó como control de carga. Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes.

La activación de los receptores pro-apoptóticos por TRAIL, induce el procesamiento apical de la procaspasa 8 para generar la subunidad pequeña, p12 y el fragmento intermedio p43/41, el cuál será seguidamente procesado para producir la subunidad catalíticamente activa p18 (Sprick et al. 2000). Para elucidar el mecanismo responsable de los efectos de TGF- β sobre la sensibilidad a TRAIL de células no tumorales epiteliales de mama, determinamos el procesamiento temprano de la procaspasa 8 en células MCF10A cultivadas en presencia o ausencia de TGF- β durante 24 horas y posteriormente tratadas con TRAIL, observando un retraso en el procesamiento de la procaspasa 8, determinado como la producción del fragmento p43/41 y la subunidad p18 (**Figura 25A**).

Continuando con el estudio de la acción inhibidora de TGF- β en la señalización apoptótica temprana activada por TRAIL, examinamos el reclutamiento de los distintos componentes del DISC de TRAIL en células MCF10A. Para ello, medimos la capacidad de TRAIL para formar un complejo de muerte (DISC) funcional en células que han sido tratadas o no con TGF- β durante 24 horas. En la figura 25B se puede observar como el tratamiento con TGF- β reduce significativamente la formación del DISC. Los niveles de TRAIL-R2/DR5, FADD y procaspasa 8 reclutados en el DISC de TRAIL son menores en las células MCF10A tratadas con TGF- β si las comparamos con aquellas que han crecido en ausencia de este factor. Además, la activación del procesamiento de la procaspasa 8 y el corte de FLIP(L) en el DISC tras la adición de TRAIL se encuentran igualmente reducidas en las células que han sido tratadas previamente con TGF- β (**Figura 25B**).

Recientemente se ha demostrado que TRAIL induce cambios en la localización subcelular de los componentes del DISC necesarios para conseguir una completa activación de caspasa 8 (Jin et al. 2009).

Para examinar la localización subcelular de caspasa 8 en células MCF10A antes y después del tratamiento con TRAIL, realizaremos un fraccionamiento celular que permite obtener 3 fracciones diferenciadas divididas en citosol, membrana y citoesqueleto o lipid/rafts. Tal y como ya se había descrito (Jin et al. 2009), TRAIL induce un incremento en los niveles proteicos de Caspasa 8 en el compartimento que contiene las proteínas del citoesqueleto y las plataformas de lipid rafts. Sin embargo, las células MCF10A cultivadas en presencia de TGF- β durante 24 horas y tratadas posteriormente con TRAIL, presentan una translocación de caspasa 8 considerablemente menor tanto a la fracción de membrana como a la de citoesqueleto/lipid rafts (**Figura 25C**). En conjunto, todos estos resultados indican que el tratamiento con TGF- β inhibe los eventos tempranos de la señalización de apoptosis inducida por TRAIL en células humanas epiteliales de mama.

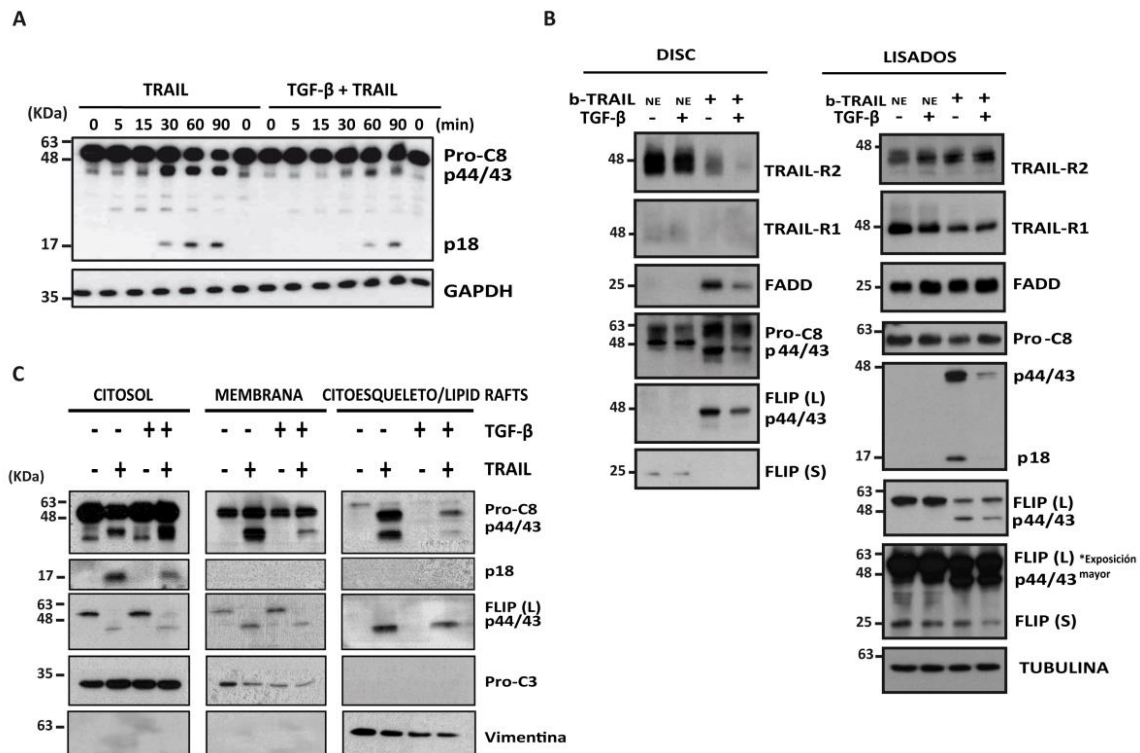


Figura 25 | TGF- β inhibe la señalización temprana inducida por TRAIL. (A) Células MCF10A cultivadas en medio con EGF fueron tratadas con o sin TGF β (10ng/ml) durante 24 horas, tras las cuales se trataron con TRAIL (500ng/ml) durante los tiempos indicados. El procesamiento de caspasa-8 se analizó mediante western-blot. Los niveles de expresión de GAPDH se emplearon como control de carga. **(B)** Células MCF10A se trataron o no con TGF β (10ng/ml) durante 24 horas y posteriormente fueron incubados con TRAIL-biotinilado (b-TRAIL) a 1 μ g/ml durante 60 minutos. Los receptores control sin estimular (NE) representan la adición de b-TRAIL al volumen equivalente del lisado aislado procedente de células sin estimular y seguidamente se aisló el DISC tal y como se describe en materiales y métodos. Los niveles de TRAIL-R2, TRAIL-R1, FADD, caspasa-8, FLIP, y Tubulina como control de carga, se analizaron mediante western-blot. Los Inputs, también se incluyen como control de las cantidades de estas proteínas en los lisados celulares. **(C)** Células MCF10A se trataron con o sin TGF β (10ng/ml) durante 24 horas, tras las cuales se trataron con TRAIL (500ng/ml) durante 60 minutos y se realizó un fraccionamiento celular tal y como se detalla en materiales y métodos. Las fracciones celulares que contienen el citosol, la membrana y los lipid-rafts se analizaron mediante western-blot con anticuerpos específicos frente a caspasa-8, FLIP, caspasa-3 y Vimentina. Los datos mostrados son representativos de 3 experimentos independientes.

3.2 La transición epitelio-mesénquima no es necesaria para la inhibición mediada TGF- β de la apoptosis inducida por TRAIL en células no tumorales epiteliales de mama.

La transición epitelio-mesénquima (EMT) es un proceso por el que las células adquieren características mesenquimales que les confieren capacidad para invadir y migrar. TGF- β es un inductor clásico de transición epitelio-mesénquima (EMT) en células epiteliales de mama, y además, se ha demostrado que la inducción de EMT por TGF- β es un proceso secuencial de 2 pasos en el que las células epiteliales (E) primero transitan hasta un primer estado de EMT parcial (P) que conserva algunas características epiteliales pero también muestra ciertos rasgos mesenquimales, para finalmente, dependiendo de la duración y fuerza del estímulo de TGF- β , alcanzar el estado mesenquimal (M) (Miettinen et al. 1994; De Herreros et al. 2010; Zhang et al. 2014). Recientemente se ha demostrado que la EMT puede disminuir la señalización de apoptosis vía los receptores de muerte TRAIL-R1/DR4 y TRAIL-R2/DR5, a través de un mecanismo que implica la pérdida de la proteína de adhesión celular E-caderina, en células tumorales (Lu et al. 2014).

Por estos antecedentes, quisimos investigar el papel de la E-caderina y de la EMT en la inhibición por TGF- β de la apoptosis inducida por TRAIL observada en nuestros experimentos con células no tumorales epiteliales de mama dependientes de EGF. Para ello, en primer lugar analizamos la expresión y localización de la proteína E-caderina en células MCF10A tratadas o no con TGF- β durante 24 horas, tiempo tras el cual, la activación de caspasa 8 por TRAIL se encuentra claramente inhibida (**Figura 25A**). La morfología celular, así como los niveles celulares totales de E-caderina y su localización en la superficie celular permanecen invariables en las células cultivadas en presencia de TGF- β durante 24 horas con respecto a las células no tratadas (**Figura 26A, B, C**). Se observaron resultados similares al analizar los niveles de E-caderina tras un tratamiento con TGF- β , en otros dos modelos de células epiteliales de mama dependientes de EGF (**Figura 26D**). Sin embargo, si exponemos las células a TGF- β durante 7 días, podemos observar como la expresión de los marcadores epiteliales E-caderina y ocludina disminuye, mientras que aumenta la expresión de Fibronectina, marcador mesenquimal (**Figura 26E, F**).

Para profundizar en el papel de la E-caderina y en base a lo descrito en líneas tumorales (Lu et al. 2014) decidimos evaluar si la ausencia de la proteína E-caderina tiene un papel en la apoptosis inducida por TRAIL en células no tumorales epiteliales de mama. Para ello, realizamos un silenciamiento de la proteína E-caderina mediante siRNA y determinamos el efecto en la apoptosis inducida por TRAIL en células MCF10A.

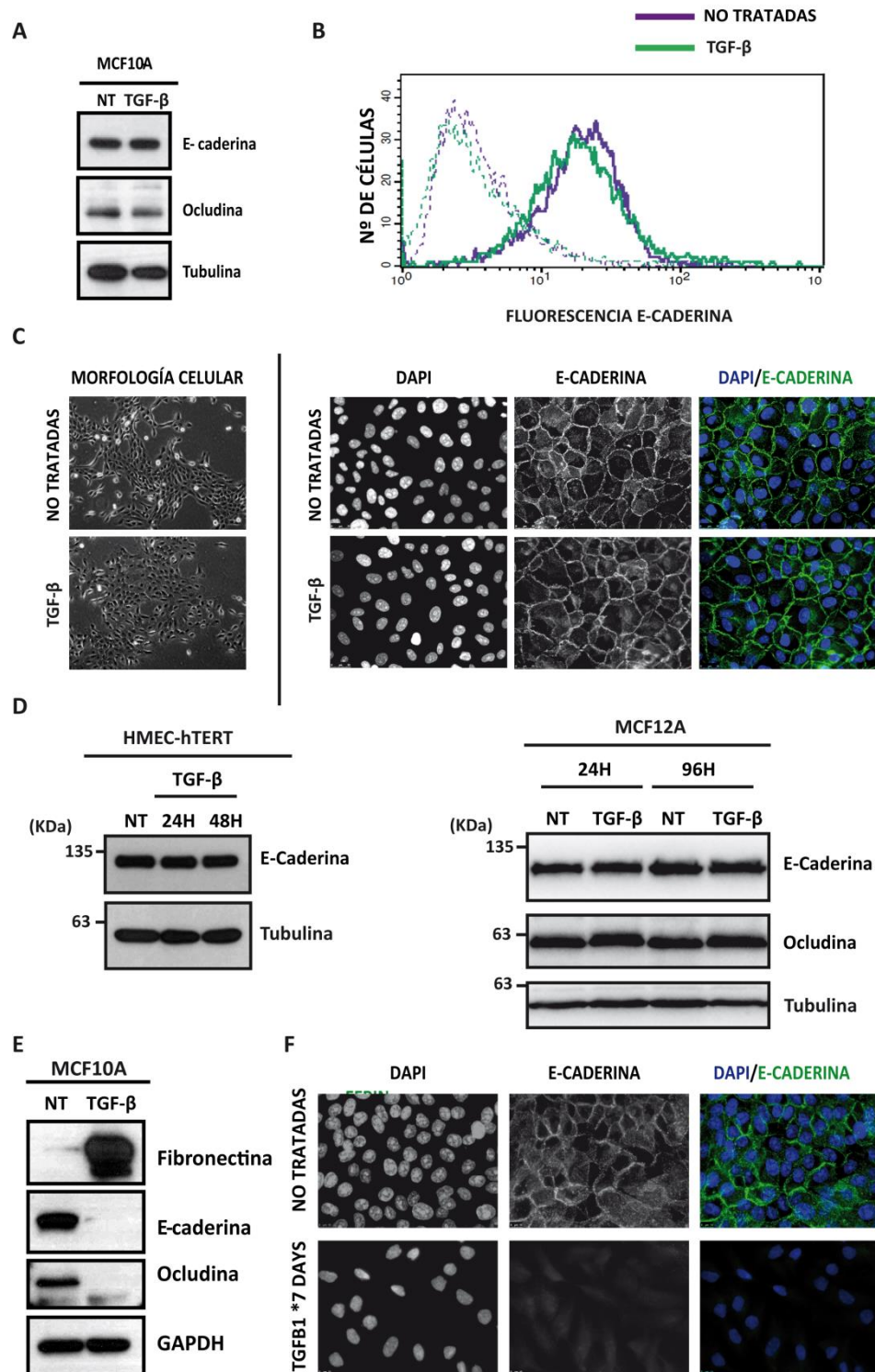


Figura 26 | El tratamiento de 24 horas con TGF-β no induce EMT en células epiteliales no tumorales de mama. (A) Células MCF10A cultivadas en medio con EGF se trataron con o sin TGFβ (10ng/ml) durante 24 horas. Los niveles de expresión de E-caderina y Occludina se analizaron mediante western-blot. La Tubulina se empleó como control de carga. **(B)** Células MCF10A se trataron como en (A). La expresión en la superficie celular de E-caderina se determinó mediante citometría de flujo tal y como se describe en materiales y métodos. Células incubadas solo con anticuerpo secundario marcado con FITC se empleó como control de la fluorescencia basal de células tratadas o no con TGFβ. **(C)** Células MCF10A tratadas como en (A), **(panel izquierdo)** Imágenes representativas obtenidas por microscopía de contraste de fases muestran la morfología celular, **(panel derecho)** Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia. La expresión de E-caderina se analizó mediante Inmunofluorescencia una vez las células fueron fijadas y teñidas con anticuerpos específicos anti E-caderina. Los

núcleos se tiñeron con DAPI. **(D)** Células epiteliales de mama (**panel izquierdo**) HMEC-hTERT y (**panel derecho**) MCF12A, se trataron con TGF β (10ng/ml) durante los tiempos indicados. Los niveles de expresión de E-caderina y Ocludina se analizaron mediante western-blot. La Tubulina se empleó como control de carga. **(E)** Células MCF10A se trataron o no con TGF β (10ng/ml) durante 7 días. Los niveles de expresión Fibronectina, E-caderina y Ocludina se analizaron mediante western-blot. El GAPDH se empleó como control de carga. **(F)** Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia de células MCF10A tratadas como en (E). La expresión de E-caderina se analizó mediante Inmunofluorescencia una vez las células fueron fijadas y teñidas con anticuerpos específicos anti E-caderina. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes.

Los resultados mostrados en la figura 27A muestran claramente que el silenciamiento de E-caderina no afecta a la sensibilidad de estas células a TRAIL. Además, si inhibimos específicamente la uniones homofílicas de E-caderina incubando las células MCF10A con un anticuerpo bloqueante de su función frente a su dominio extracelular DECMA-1 (Frixen et al. 1991), no observamos ningún efecto en la apoptosis inducida por TRAIL (**Figura 27B**).

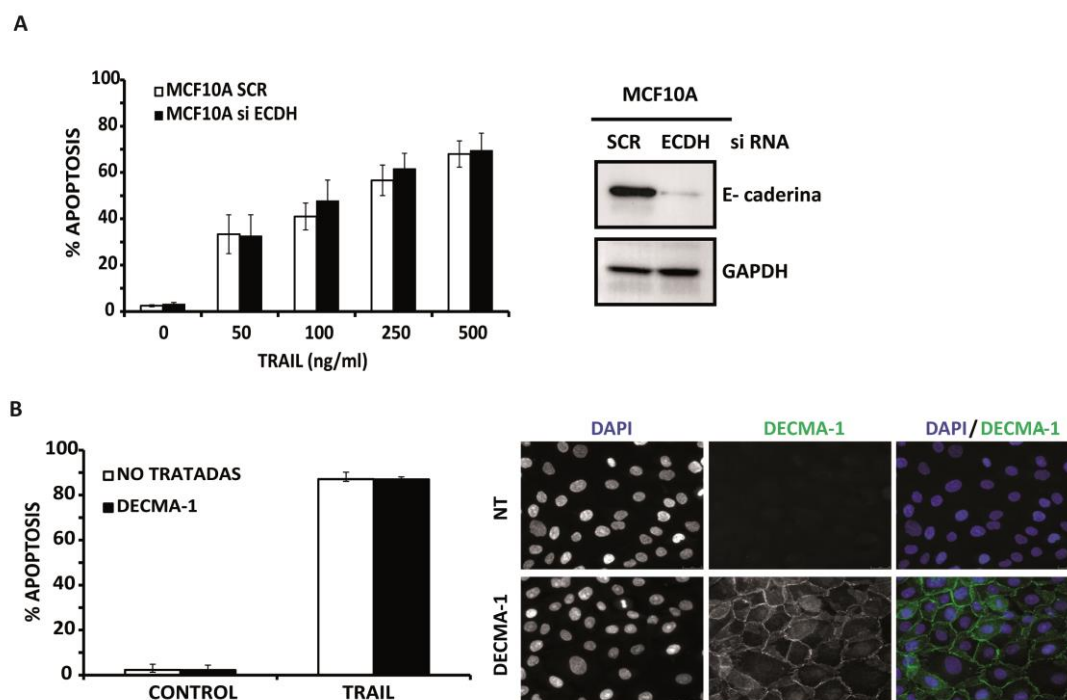


Figura 27 | La E-caderina no está implicada en sensibilidad a TRAIL de células no tumorales de mama. (A) Células MCF10A se transfectaron con el oligo de RNA de interferencia frente a E-caderina o el oligo Scrambled (SCR) a una concentración de 50nM durante 48 horas tal y como se especifica en materiales y métodos. Transcurrido ese tiempo las células se trataron con las dosis indicadas de TRAIL durante 6 horas. La apoptosis se midió como el porcentaje de células en subG1 por citometría de flujo, tal y como se describe en materiales y métodos. Los histogramas muestran los valores \pm SEM de 3 experimentos independientes. Los niveles de expresión de E-caderina se analizaron mediante western-blot. EL GAPDH se empleó como control de carga. **(B)** Células MCF10A se trataron con o sin el anticuerpo bloqueante de E-caderina: DECMA-1 (10 μ g/ml) durante 6 horas, (**panel izquierdo**) tras las cuales las células se trataron con TRAIL (250 ng/ml) durante 24 horas. La apoptosis se midió como el porcentaje de células en subG1 por citometría de flujo, tal y como se describe en materiales y métodos. Los histogramas muestran los valores \pm SEM de cuatro experimentos independientes, (**panel derecho**) las células tratadas fueron entonces fijadas y la presencia del anticuerpo DECMA-1 unido a E-caderina en la superficie celular se detectó por Inmunofluorescencia con un anticuerpo secundario frente a ratón; Alexa488.

Todos estos datos indican que la mayor resistencia a la apoptosis inducida por TRAIL observada como consecuencia de un tratamiento de 24 horas con TGF- β no depende, en células humanas epiteliales de mama, de la pérdida de expresión en la superficie celular de la proteína E-caderina.

Tal y como analizamos en el capítulo anterior y de acuerdo con estudios previos, la transformación de células epiteliales con el oncogén ERBB2/Her2 induce transición epitelio- mesénquima (EMT) (Baeckström et al. 2000). Para profundizar en el estudio del impacto de la EMT en la regulación por TGF- β de la apoptosis inducida por TRAIL, empleamos el modelo de células humanas no tumorales MCF10A pBabe/pNeuT que caracterizamos en el capítulo anterior y en el cual la sobreexpresión de una forma constitutivamente activa del oncogén ERBB2/Her2 induce la adquisición de un fenotipo mesenquimal (**Figura 16**). Una dosis-respuesta de TRAIL nos muestra como las células mesenquimales MCF10A-pNeuT son significativamente más sensibles que las células epiteliales MCF10A-pBabe (**Figura 28A**). Además, el tratamiento con TGF- β durante 24 horas inhibe también la sensibilidad a TRAIL de las células mesenquimales MCF10A-pNeuT (**Figura 28B**).

En conjunto, todos estos resultados muestran, la existencia en células humanas epiteliales de mama, de un mecanismo de resistencia al ligando de muerte TRAIL, inducido por TGF- β e independiente del proceso de EMT.

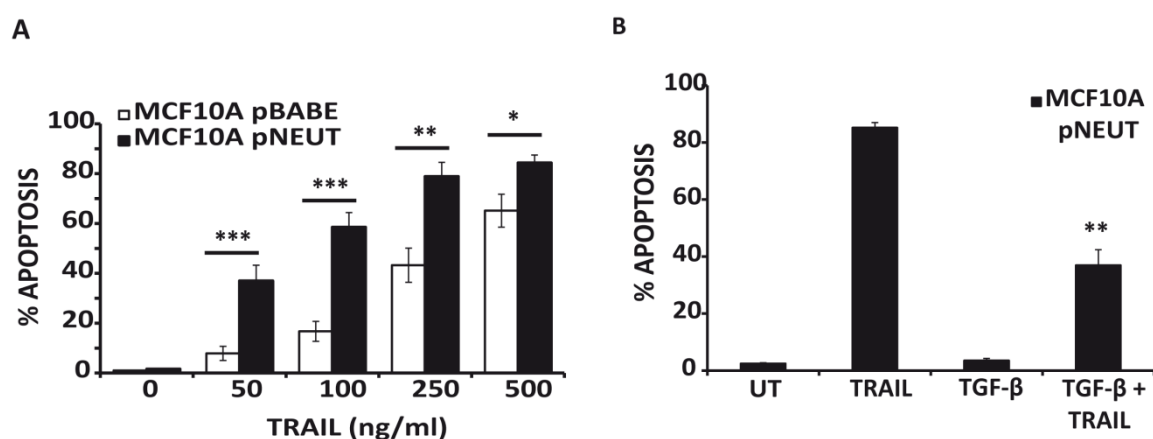


Figura 28 | TGF- β inhibe la apoptosis inducida por TRAIL en células con fenotipo mesenquimal MCF10A que sobreexpresan una forma mutada de ErbB2. (A) Células MCF10A pBabe/pNeuT se trataron con las dosis indicadas de TRAIL durante 24 horas. La apoptosis se midió como el porcentaje de células en subG1 por citometría de flujo, tal y como se describe en materiales y métodos. Los histogramas muestran los valores \pm SEM de siete experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p > 0,01$, *** $p < 0,001$. **(B)** Células MCF10A pNeuT se trataron con TGF β (5ng/ml) durante 24 horas y posteriormente se trataron con o sin TRAIL (500ng/ml) durante 6 horas. La apoptosis se midió como el porcentaje de células en subG1 por citometría de flujo, tal y como se describe en materiales y métodos. Los histogramas muestran los valores \pm SEM de tres experimentos independientes. ** $p > 0,01$.

3.3. TGF- β reduce específicamente los niveles de expresión de TRAIL-R2/DR5 en la superficie celular.

Con el objetivo de profundizar en el mecanismo molecular implicado en la inhibición por TGF- β de la apoptosis inducida por TRAIL, comprobamos si el tratamiento con TGF- β durante 24 horas afectaba a los niveles de expresión de las principales proteínas pro y anti apoptóticas que forman parte del complejo inductor de muerte (DISC) de TRAIL y por tanto son relevantes en las primeras etapas de la señalización de TRAIL. Sin embargo, los niveles totales de las proteínas pro-apoptóticas TRAIL-R2/DR5, FADD y Caspasa-8 así como las proteínas anti-apoptóticas FLIP(L) y FLIP(S) no varían en respuesta al tratamiento con TGF- β (Figura 29A y 30A).

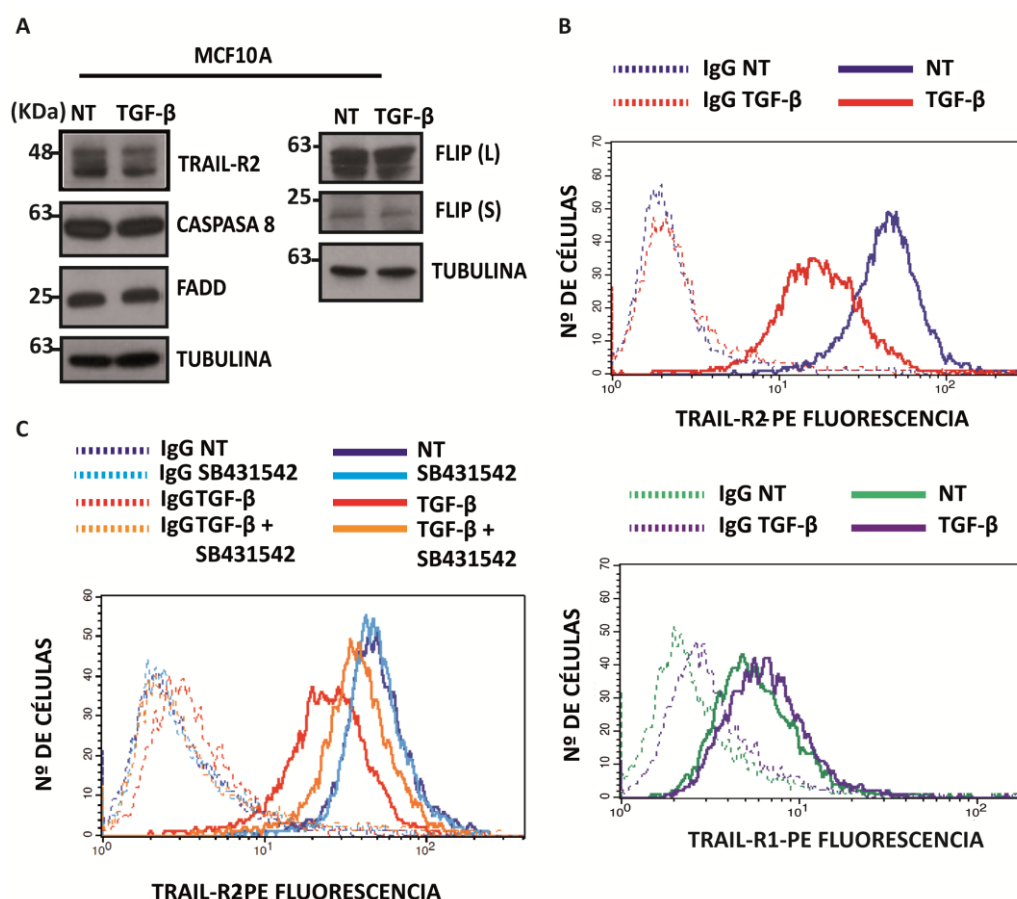


Figura 29 | La expresión de TRAIL-R2 en la superficie celular se reduce tras un tratamiento con TGF- β . (A) Células MCF10A fueron tratadas o no con TGF- β (5 ng/ml) durante 24 h. Los niveles de expresión de Caspasa-8, TRAIL-R2, FLIP y FADD se analizaron en extractos celulares totales por western-blot. La Tubulina se empleó como control de carga. (B) Células MCF10A tratadas como en (A). La expresión en la superficie celular de TRAIL-R2 y TRAIL-R1 se analizó mediante citometría de flujo con anticuerpo específicos frente a TRAIL-R2 y TRAIL-R1 unidos a PE, tal y como se describe en materiales y métodos. Células incubadas con la inmunoglobulina IgG-PE, se emplearon como control de fluorescencia basal. Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes. (C) Células MCF10A se trataron con o sin el inhibidor del TGF- β R1: SB431542 (0,2 μ M) y TGF- β (5 ng/ml) durante 24 horas. La expresión en la superficie celular de TRAIL-R2 se analizó mediante citometría de flujo con el anticuerpo específico TRAIL-R2-PE tal y como se describe en materiales y métodos. Células incubadas con la inmunoglobulina IgG-PE, se emplearon como control de fluorescencia basal. Los datos mostrados son representativos de dos experimentos independientes.

Por otro lado, se ha descrito recientemente, que la pérdida de expresión en membrana plasmática de los receptores pro-apoptóticos de TRAIL es suficiente para que algunas células tumorales adquieran resistencia a TRAIL, independientemente de los niveles de expresión de proteína total o del estado de otros componentes implicados en la señalización apoptótica (Twomey et al. 2015; Pennarun et al. 2010; Zhang & Zhang 2008).

En base a esto, determinamos los niveles en la superficie celular de los receptores pro-apoptóticos TRAIL-R1/DR4 y TRAIL-R2/DR5 de células control y células incubadas con TGF- β durante 24 horas. En primer lugar observamos, que las células MCF10A expresan mayores niveles de TRAIL-R2/DR5 que de TRAIL-R1/DR4 en la superficie celular. Sin embargo, lo interesante es que el tratamiento con TGF- β durante 24 horas reduce específicamente los niveles de TRAIL-R2/DR5 en la superficie celular (**Figura 29B, panel superior**) sin afectar de manera significativa a los niveles de TRAIL-R1/DR4 (**Figura 29B, panel inferior**). Además, la reducción de los niveles de TRAIL-R2/DR5 inducida por el tratamiento con TGF- β se está produciendo a través su tradicional mecanismo de acción, ya que la incubación de las células con TGF- β en presencia del inhibidor del TGF β R1 SB431542, previene significativamente la bajada en los niveles de TRAIL-R2/DR5 (**Figura 29C**). Finalmente, determinamos en HMEC, otra línea no tumoral de mama dependiente de EGF, que el tratamiento con TGF- β reduce también los niveles de TRAIL-R2/DR5 en membrana plasmática (**Figura 30B**).

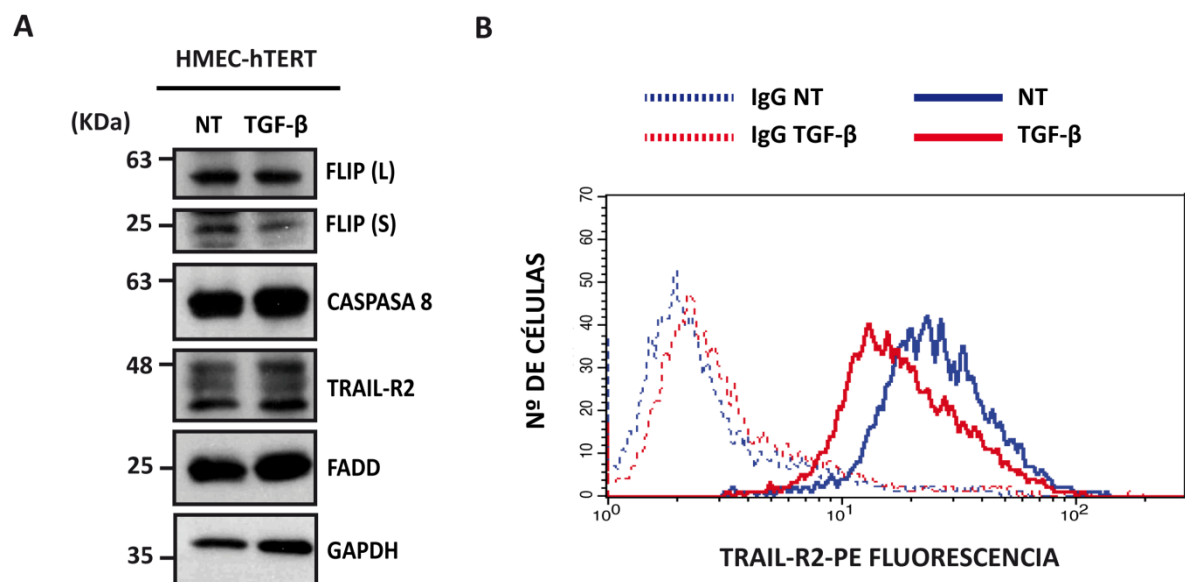


Figura 30 | El tratamiento con TGF- β reduce específicamente los niveles de TRAIL-R2 en la superficie celular. (A) Células HMEC-hTERT fueron tratadas o no con TGF- β (5 ng/ml) durante 24 h. Los niveles de expresión de Caspasa-8, TRAIL-R2, FLIP y FADD se analizaron en extractos celulares totales por western-blot. El GAPDH se empleó como control de carga. **(B)** Células HMEC-hTERT tratadas como en (A). La expresión en la superficie celular de TRAIL-R2 se analizó mediante citometría de flujo con el anticuerpo específico TRAIL-R2-PE tal y como se describe en materiales y métodos. Células incubadas con la inmunoglobulina IgG-PE, se emplearon como control de fluorescencia basal. Los datos mostrados son representativos de dos experimentos independientes.

Debido a que TGF- β está regulando específicamente los niveles de TRAIL-R2/DR5 en la superficie celular y para confirmar que la reducción de los niveles en membrana de este receptor proapoptótico se encuentra directamente relacionado con la pérdida de sensibilidad a TRAIL inducida por TGF- β de las células MCF10A, decidimos evaluar la contribución de los receptores pro-apoptóticos TRAIL-R1/DR4 y TRAIL-R2/DR5 a la apoptosis inducida por el TRAIL en células MCF10A. Como se puede observar en la **figura 31**, el silenciamiento mediante RNA de interferencia demuestra que TRAIL-R2/DR5 es el principal receptor pro-apoptótico en estas células y que TRAIL-R1/DR4 también contribuye parcialmente a la sensibilidad de las MF10A al ligando de muerte TRAIL.

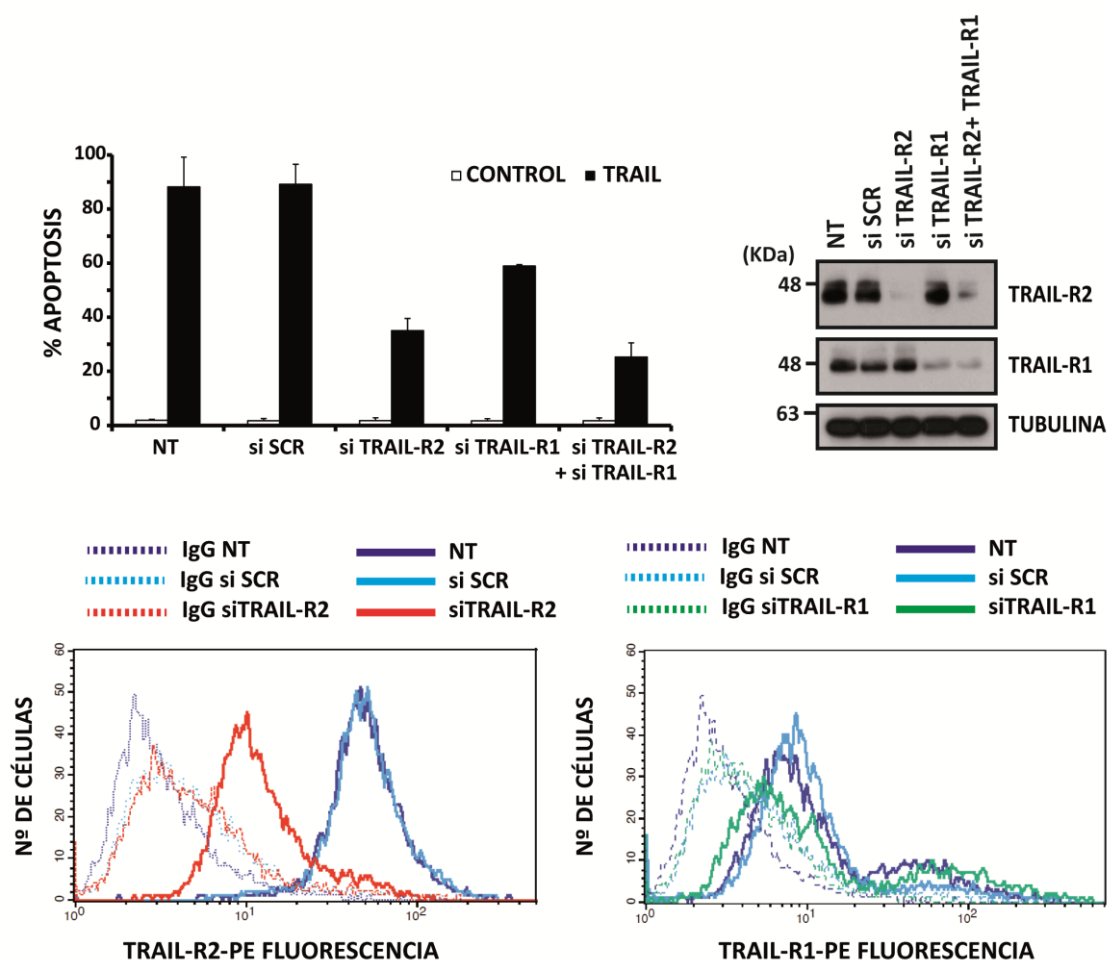


Figura 31 | TRAIL-R2 es el principal receptor pro-apoptótico en células MCF10A. (A) Células MCF10A se transfectaron con el oligo de RNA de interferencia frente a TRAIL-R1, TRAIL-R2, el oligo Scrambled (SCR) o no transfectadas (NT) a una concentración de 50nM durante 30 horas tal y como se especifica en materiales y métodos. (Panel izquierdo) Transcurrido ese tiempo las células se trataron con TRAIL (250ng/ml) durante 24 horas. La apoptosis se midió como el porcentaje de células en subG1 por citometría de flujo, tal y como se describe en materiales y métodos. Los histogramas muestran los valores +/- SEM de dos experimentos independientes. Los niveles de expresión de TRAIL-R1, TRAIL-R2 se analizaron (Panel derecho) mediante western-blot. La Tubulina se empleó como control de carga. (Panel inferior) La expresión en la superficie celular de TRAIL-R2 y TRAIL-R1 se analizó mediante citometría de flujo con anticuerpos específicos frente a TRAIL-R2 y TRAIL-R1 unidos a PE, tal y como se describe en materiales y métodos. Células incubadas con la inmunoglobulina IgG-PE, se emplearon como control de fluorescencia basal. Los datos mostrados son representativos de dos experimentos independientes.

Además, el estudio cinético del efecto de la incubación con TGF- β en la expresión de los receptores TRAIL-R2/DR5 muestra la existencia de una correlación directa entre los niveles de TRAIL-R2/DR5 en membrana y la activación de caspasa 8, pudiéndose observar como la reducción en los niveles de expresión de TRAIL-R2/DR5 en la superficie celular coincide con la inhibición del procesamiento de procaspasa-8 inducido por TRAIL (**Figura 32**).

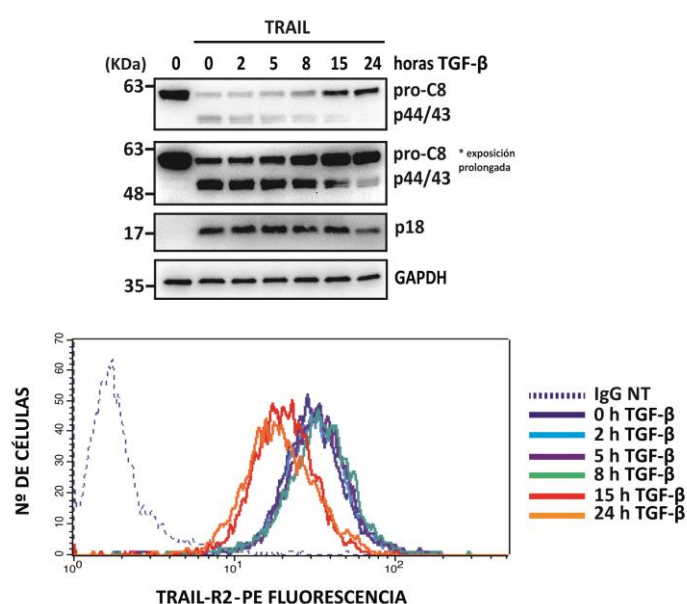


Figura 32 | La reducción de los niveles de TRAIL-R2 en la superficie celular correlaciona directamente con la inhibición de la activación de caspasa-8. Células MCF10A fueron tratadas con TGF β (5ng/ml) durante diferentes tiempos (0, 2, 5, 8, 15, 24 h) y (**panel superior**) posteriormente tratadas con TRAIL (500ng/ml) durante 60 minutos. El procesamiento de caspasa-8 se analizó mediante western-blot. Los niveles de expresión de GAPDH se emplearon como control de carga. (**Panel inferior**) La expresión en la superficie celular de TRAIL-R2 en los tiempos indicados, se analizó mediante citometría de flujo con el anticuerpo específico TRAIL-R2-PE tal y como se describe en materiales y métodos. Células incubadas con la inmunoglobulina IgG-PE, se emplearon como control de fluorescencia basal. Los datos mostrados son representativos de dos experimentos independientes.

El tratamiento con TGF- β reduce significativamente los niveles de TRAIL-R2/DR5 en la superficie celular sin alterar los niveles de expresión totales de la proteína (**Figura 29A y B panel superior**), lo que sugiere una posible acumulación del receptor en el interior de la célula. Para corroborar esta hipótesis, decidimos permeabilizar las células y medir los niveles totales de TRAIL-R2/DR5 tras el tratamiento con TGF- β .

Nuestros resultados muestran como en células tratadas con TGF- β durante 24 horas, la permeabilización con digitonina permite detectar unos niveles considerablemente mayores de TRAIL-R2/DR5 que en las mismas células no permeabilizadas, sugiriendo una acumulación intracelular del receptor en respuesta al tratamiento con TGF- β (**Figura 33A**).

Para confirmar si el tratamiento con TGF- β induce una acumulación de TRAIL-R2/DR5 en compartimentos intracelulares, analizamos por microscopía confocal la localización del receptor en células epiteliales de mama MCF10A tratadas o sin tratar con TGF- β durante 24 horas.

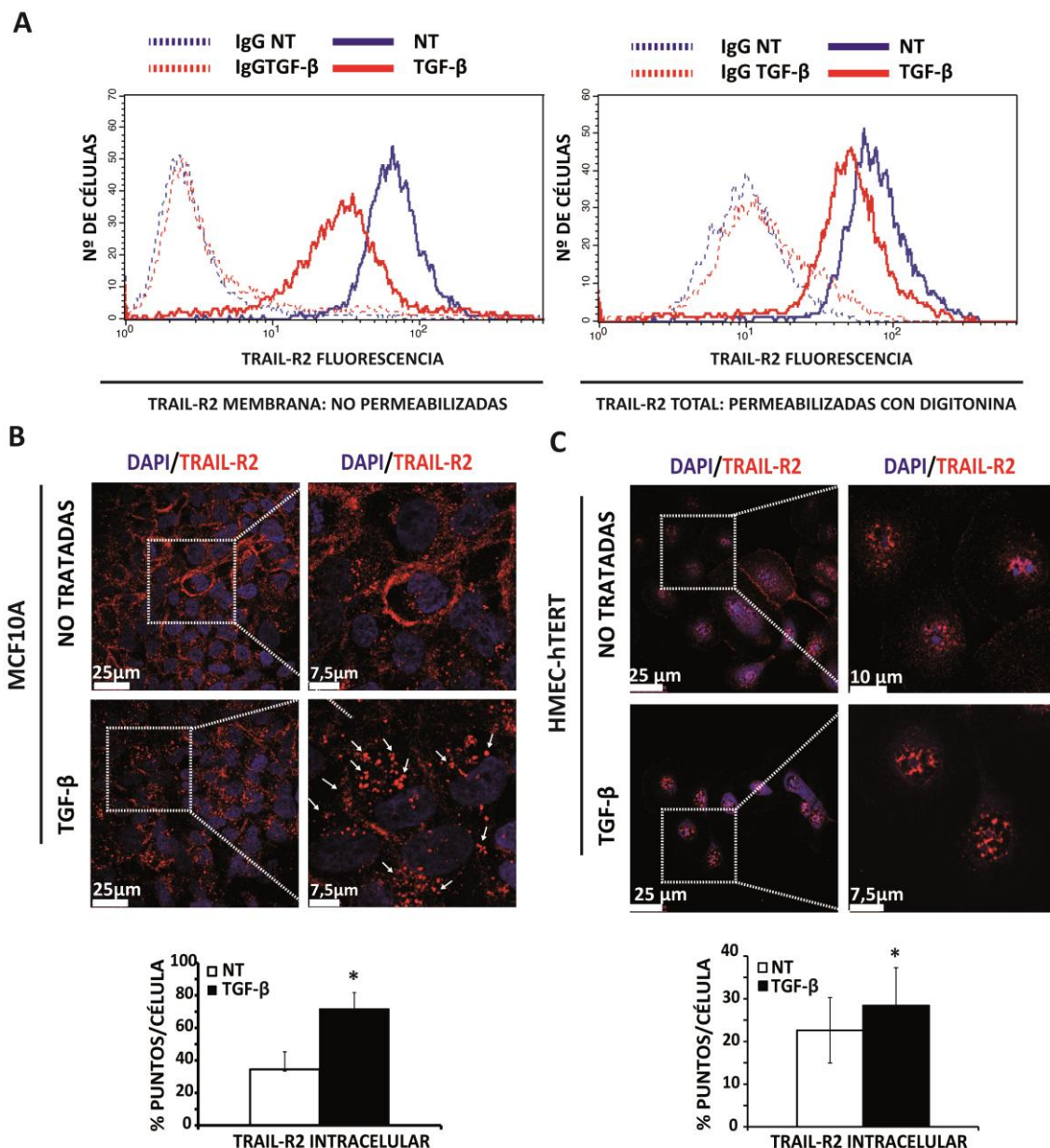


Figura 33 | El tratamiento con TGF-β induce una localización intracelular de TRAIL-R2. (A) Células MCF10A fueron tratadas con TGFβ (5ng/ml) durante 24 horas y posteriormente permeabilizadas o no con digitonina (concentración y tiempo). La expresión en la superficie celular de TRAIL-R2 en los tiempos indicados, se analizó mediante citometría de flujo con el anticuerpo específico TRAIL-R2-PE tal y como se describe en materiales y métodos. Células incubadas con la inmunoglobulina IgG-PE, se emplearon como control de fluorescencia basal. Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes. (B) Imágenes representativas de microscopía confocal de células MCF10A y (C) HMEC-hTERT, tratadas con TGFβ (5ng/ml) durante 24 horas y posteriormente fijadas y teñidas con anticuerpos anti-TRAIL-R2. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Barra=25μm. Barra (zoom)= 7,5 μm. La cuantificación del número de puntos por células se realizó con el software metamorph con 100 células por condición y experimento. Los histogramas muestran los valores +/- SEM de tres experimentos independientes. *p>0,05.

Tal y como se puede observar en la **figura 33B**, el tratamiento con TGF-β provoca una reducción en los niveles de TRAIL-R2/DR5 en la superficie celular, así como un significativo incremento de la localización de TRAIL-R2/DR5 en compartimentos intracelulares. Observamos el mismo fenómeno en

respuesta al tratamiento con TGF- β en HMEC-hTERT (**Figura 33C**). Para confirmar que la tinción es específica de TRAIL-R2/DR5, diseñamos experimentos de silenciamiento de la expresión del receptor mediante siRNA, obteniendo una disminución tanto de la tinción en membrana como de la tinción intracelular (**Figura 34**).

En conjunto, estos resultados sugieren que TGF- β induce en células epiteliales de mama, una acumulación intracelular de TRAIL-R2/DR5 responsable de la reducción de los niveles de expresión de TRAIL-R2/DR5 en la superficie celular, la cual podría estar contribuyendo a la inhibición de la formación del DISC y en consecuencia a la menor activación de caspasa 8 por TRAIL.

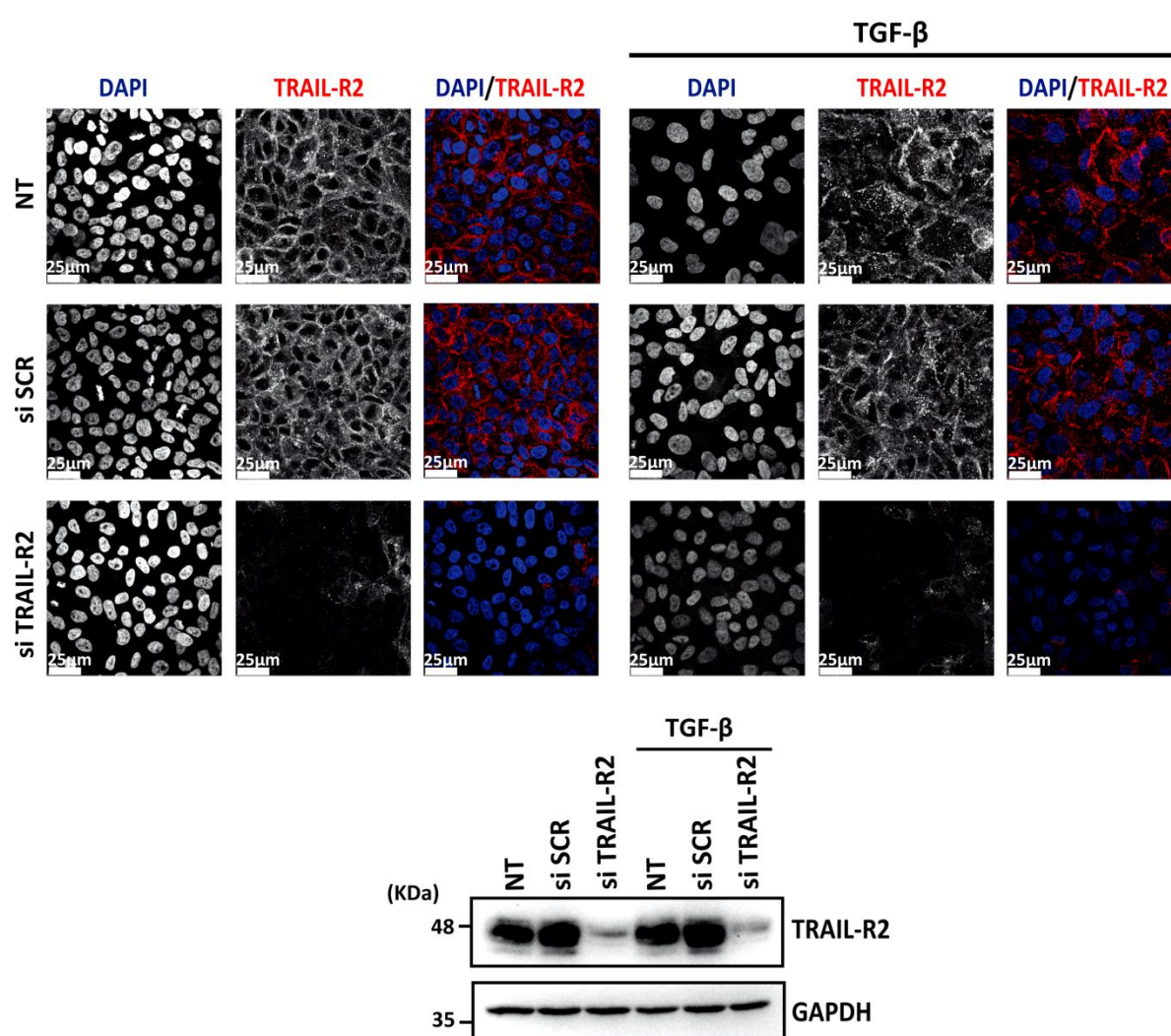


Figura 34 | La tinción de TRAIL-R2 es específica. Células MCF10A se transfectaron con el oligo de RNA de interferencia frente a TRAIL-R2, el oligo Scrambled (SCR) o no transfectadas (NT) a una concentración de 50nM durante 24 horas y posteriormente se trataron con TGF- β (5 ng/ml) for 24 hours. (**Panel superior**) Las células fueron entonces fijadas y teñidas con anticuerpos anti-TRAIL-R2. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Barra=25 μ m. Se muestran imágenes representativas de microscopía confocal. (**Panel inferior**) Los niveles de expresión de TRAIL-R2 se analizaron mediante western-blot. EL GAPDH se empleó como control de carga. Los datos mostrados son representativos de tres experimentos diferentes.

3.4. TGF- β provoca la acumulación intracelular de TRAIL-R2/DR5 mediante un proceso independiente de ligando.

Se ha descrito que líneas tumorales de diverso origen resistentes a TRAIL, presentan elevados niveles de expresión de los receptores pro-apoptóticos TRAIL-R1/DR4 y TRAIL-R2/DR5. Sin embargo, no parece existir una correlación directa entre los niveles totales de expresión y la sensibilidad de las líneas tumorales al ligando de muerte TRAIL. De hecho, hay evidencias que demuestran que la expresión de RNA mensajero de los receptores de TRAIL, no refleja necesariamente su expresión funcional debido a las complejas modificaciones post-traduccionales a las que se someten los receptores. Entre estas modificaciones podemos encontrar la glicosilación, el tráfico hacia la membrana plasmática y el proceso de endocitosis e internalización (Twomey et al. 2015; Zhang & Zhang 2008).

Debido a que nosotros observamos una acumulación intracelular de aspecto vesicular de TRAIL-R2/DR5 e interesados en conocer el mecanismo molecular implicado en la reducción en la superficie celular de la expresión de TRAIL-R2/DR5 en células epiteliales de mama tratadas con TGF- β , decidimos analizar si TRAIL-R2/DR5 estaba siendo retenido en alguna de las estructuras implicadas en el proceso de internalización de los receptores así como en el tráfico de proteínas hacia la membrana plasmática.

La expresión de los receptores de muerte en la superficie celular depende de la translocación de la proteína desde el retículo endoplasmático-aparato de Golgi (RE-Golgi) hacia la membrana plasmática (Schneider-Brachert et al. 2013). Por otro lado, se ha descrito que la internalización de los receptores de TRAIL, en contraposición a lo que ocurre con los receptores de TNF α y de FasL (Schneider-Brachert et al. 2013), disminuye la capacidad del ligando de inducir apoptosis (Zhang et al. 2009; Zhang & Zhang 2008).

Por ello, con la intención de conocer si la reducción en los niveles de TRAIL-R2/DR5 en la membrana plasmática se debe a un incremento en la internalización de los receptores pro-apoptóticos o a un bloqueo en el transporte de proteínas desde el retículo endoplasmático (RE) a la membrana plasmática, decidimos bloquear el transporte del RE-Golgi. El tratamiento con Brefeldina-A, reduce e iguala los niveles de TRAIL-R2/DR5 en la superficie celular en células sin tratar y tratadas con TGF- β (**Figura 35**), lo que sugeriría que la reducción en los niveles TRAIL-R2/DR5 inducida por TGF- β se debe a un bloqueo en el transporte a la superficie celular de TRAIL-R2/DR5.

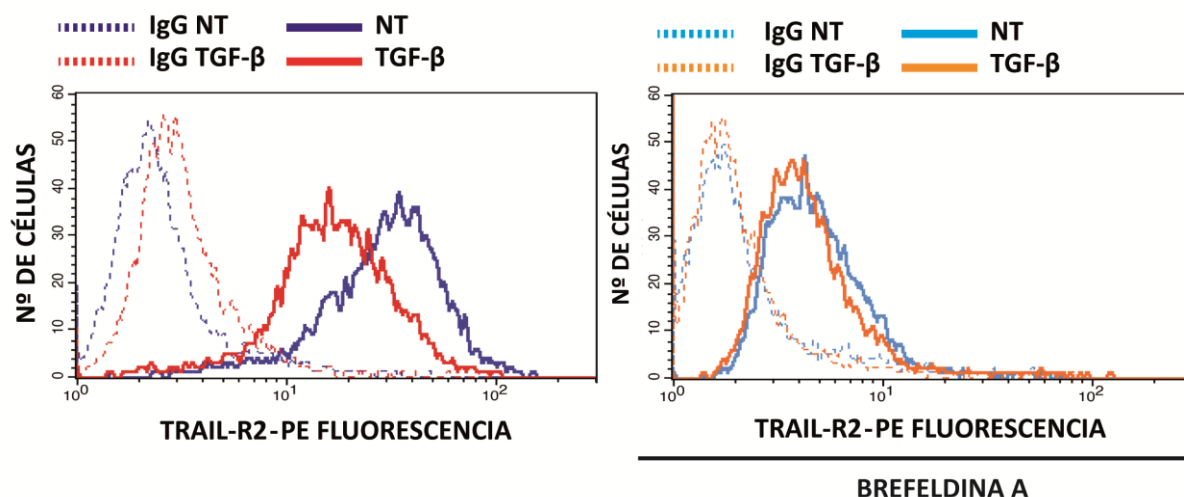


Figura 35 | La inhibición del transporte del RE al Ap. de Golgi reduce los niveles de TRAIL-R2 en la superficie celular. Células MCF10A fueron tratadas con TGF β (5ng/ml) durante 24 horas en presencia o en ausencia de Brefeldina-A (concentración). La expresión en la superficie celular de TRAIL-R2 en los tiempos indicados, se analizó mediante citometría de flujo con el anticuerpo específico TRAIL-R2-PE tal y como se describe en materiales y métodos. Células incubadas con la inmunoglobulina IgG-PE, se emplearon como control de fluorescencia basal. Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes.

En consecuencia, quisimos identificar la localización intracelular de TRAIL-R2/DR5 y analizamos mediante microscopía confocal la posible colocalización con retículo endoplasmático (RE) y con aparato de Golgi (Cis y Trans). La acumulación intracelular del TRAIL-R2/DR5 inducida por TGF- β no se corresponde con la tinción específica de RE, Cis-Golgi o Trans-Golgi (**Figura 36A, B, C**).

Del mismo modo, analizamos por microscopía confocal la posible colocalización de TRAIL-R2/DR5 con elementos clave de la ruta endosómica implicados en el reciclaje y degradación de proteínas de membrana (Caveolina, Clatrina, EEA1, Rab5-7-11), observando una colocalización parcial con todas ellas (**Figura 37A, B, C, D, E, F**).

Sin embargo, no conseguimos conocer la localización exacta donde TRAIL-R2/DR5 se está acumulando en el interior celular y consideramos que el hecho de que TGF- β esté afectando o no a la maquinaria responsable del tráfico de proteínas y reduciendo la expresión de TRAIL-R2/DR5 en la superficie celular, requiere una investigación más exhaustiva que no será desarrollada en esta tesis.

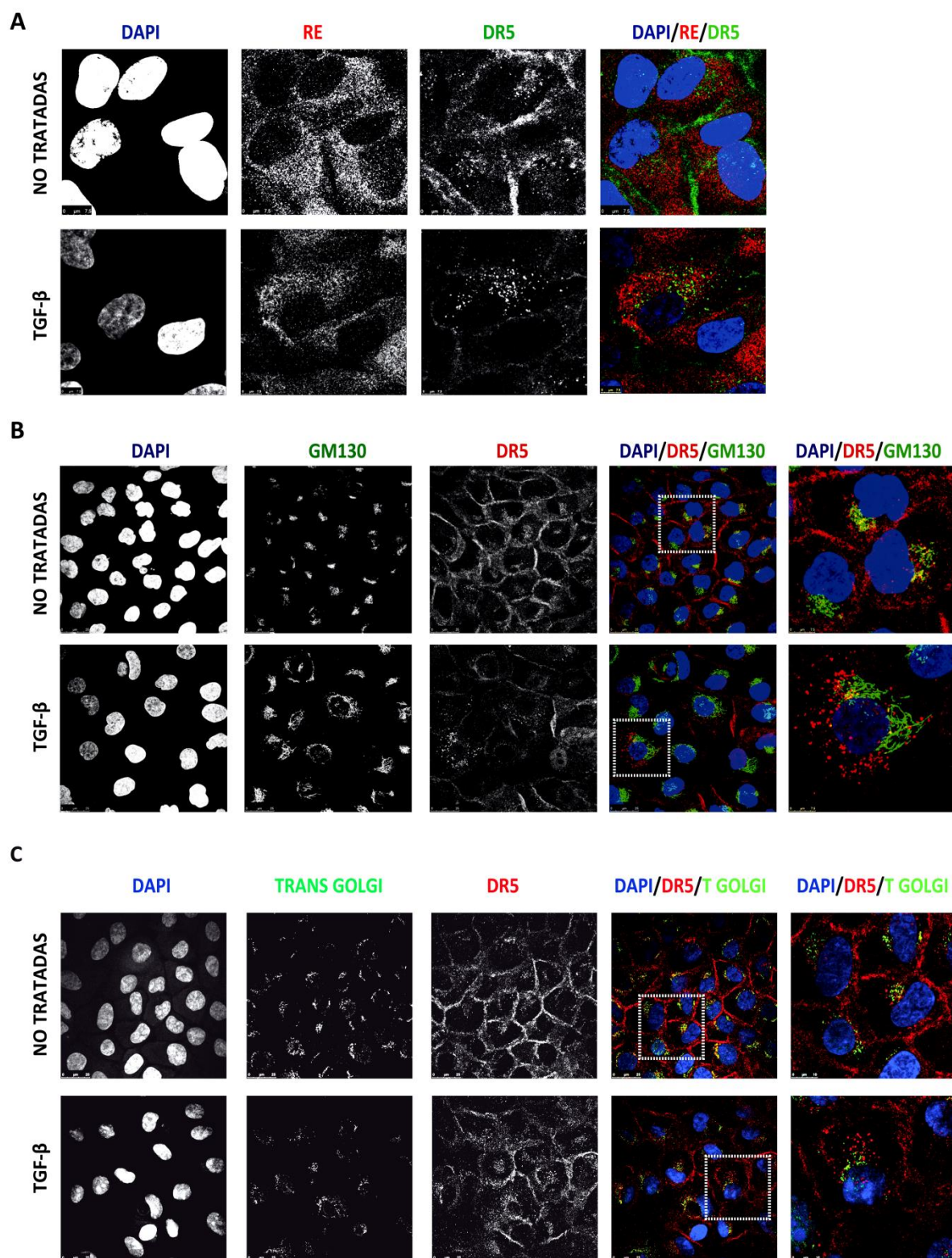
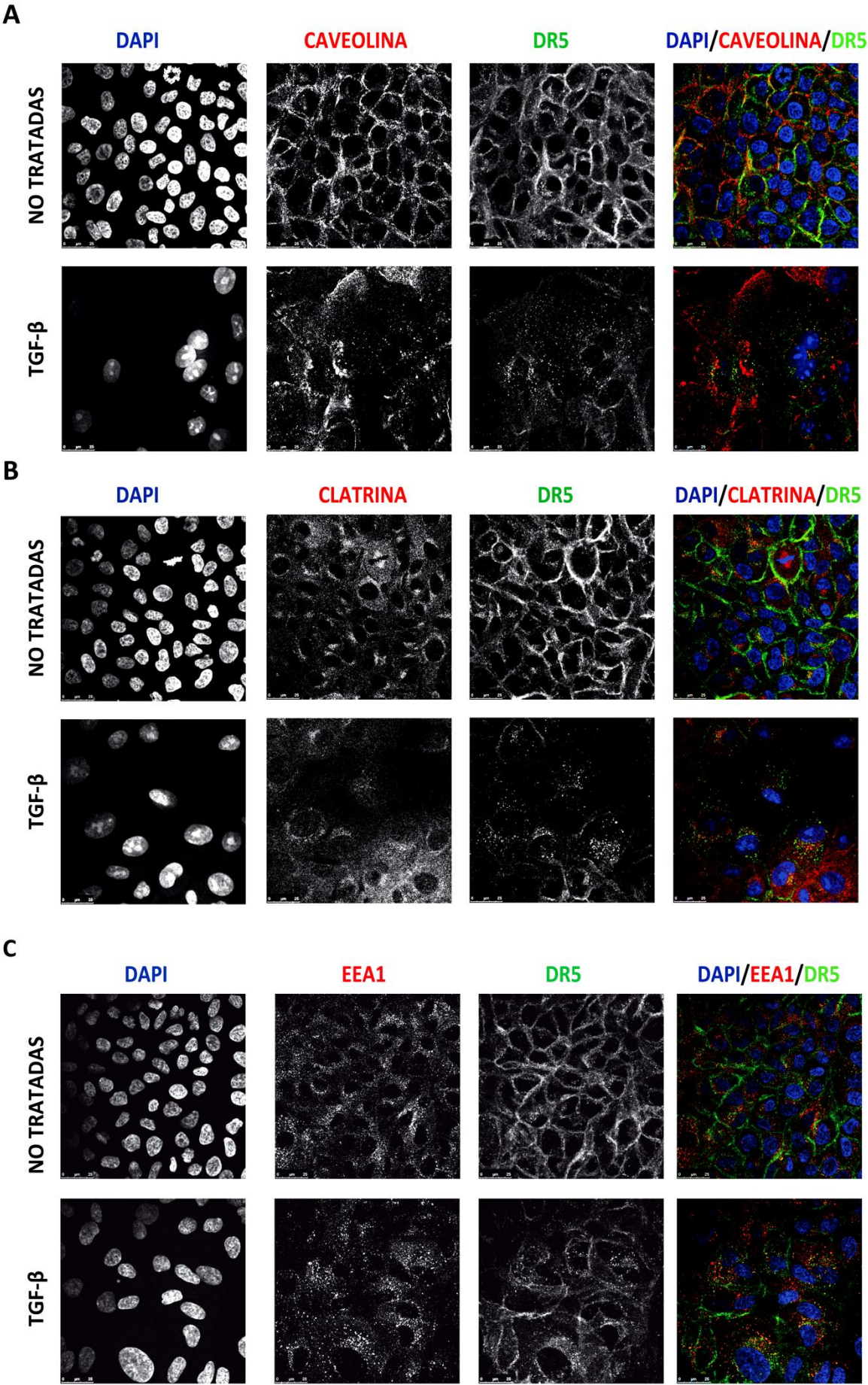
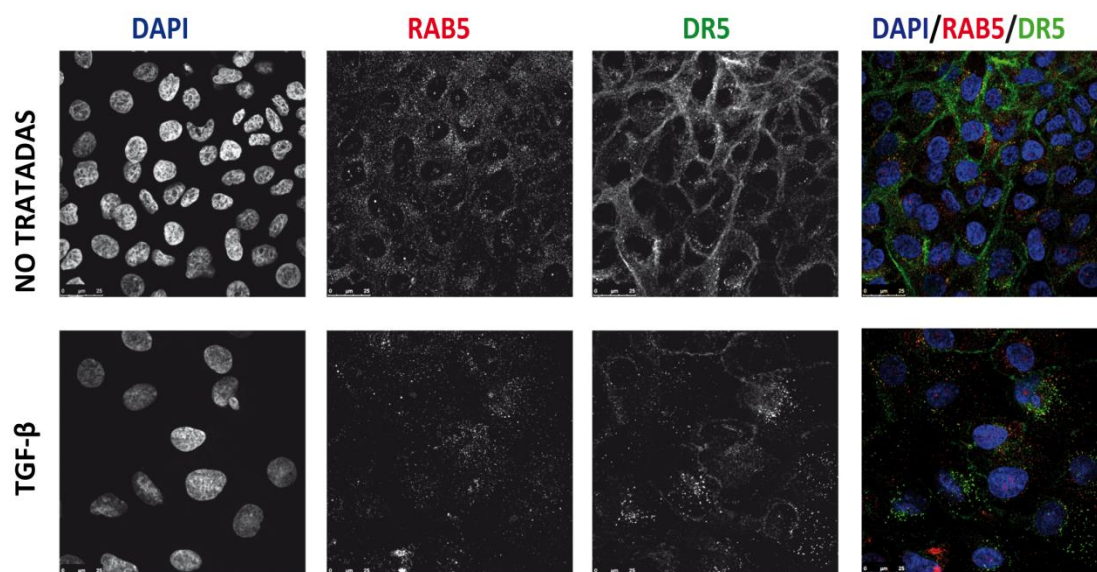


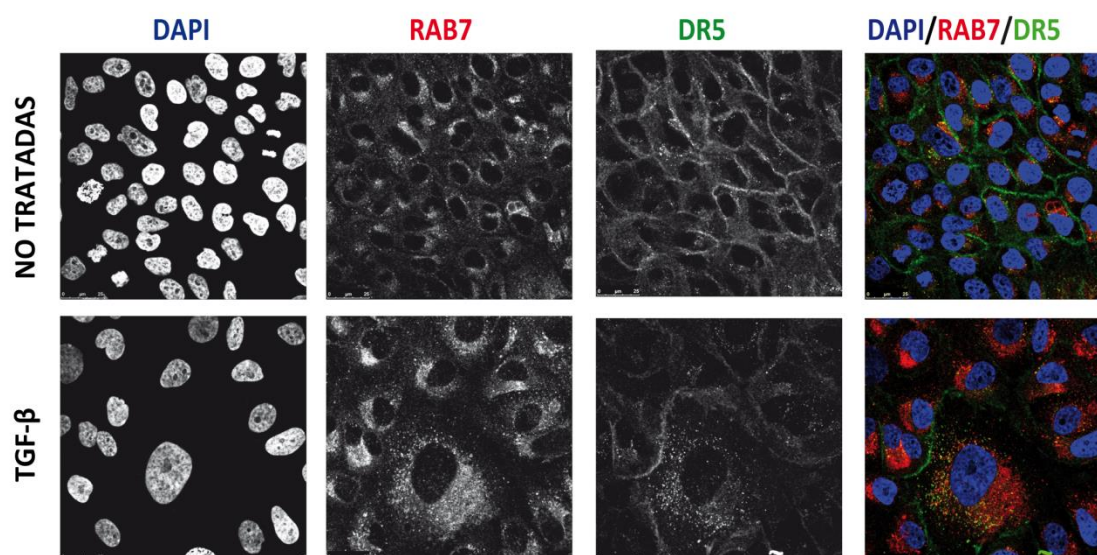
Figura 36 | TRAIL-R2 no colocaliza con Retículo endoplasmático o Golgi. Células MCF10A fueron tratadas o no con TGFβ (5ng/ml) durante 24 horas. Las células fueron entonces fijadas y teñidas con anticuerpos anti TRAIL-R2 y **(A)** anti-RE **(B)** anti-GM130 y **(C)** anti trans-golgi. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Barra=25μm. Se muestran imágenes representativas de microscopía confocal. Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes.



D



E



F

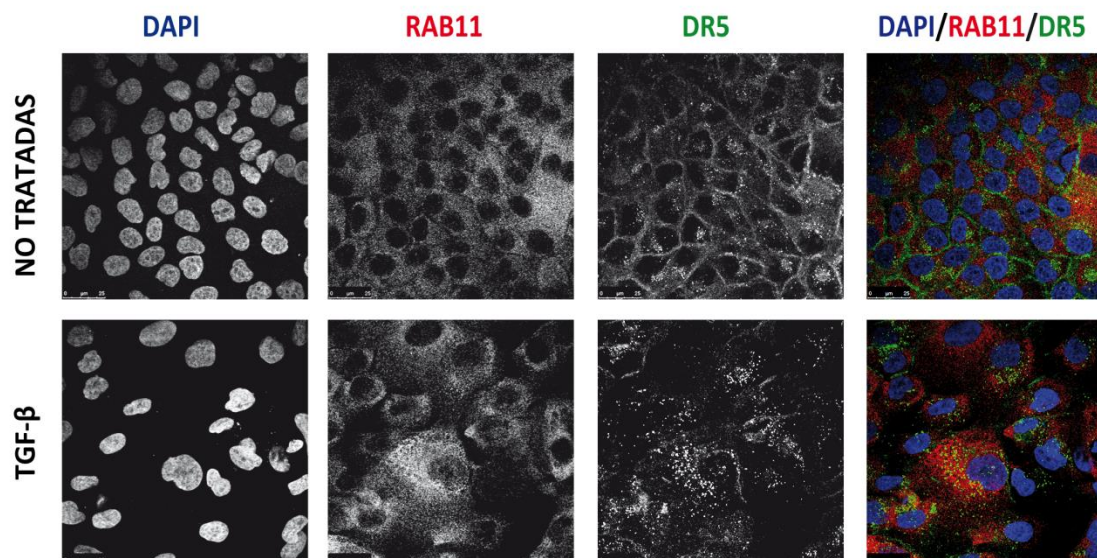


Figura 37 | TRAIL-R2 no colocaliza con proteínas de la ruta endosómica. Células MCF10A fueron tratadas o no con TGF β (5ng/ml) durante 24 horas. Las células fueron entonces fijadas y teñidas con anticuerpos anti TRAIL-R2 y **(A)** anti-caveolina **(B)** anti-clatrina, **(C)** anti-EEA1 **(D)** anti-Rab5 **(E)** anti-Rab7 y **(F)** anti-Rab11. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Barra=25 μ m. Se muestran imágenes representativas de microscopía confocal. Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes.

Aunque los resultados anteriores sugieren un posible bloqueo inducido por TGF- β del tráfico hacia la superficie celular del receptor pro-apoptótico TRAIL-R2/DR5, no tenemos evidencias que nos permitan descartar la internalización de los receptores de muerte como posible mecanismo de resistencia a TRAIL inducido por TGF- β . De hecho, se ha descrito que la internalización constitutiva o mediada por TRAIL de los receptores de muerte, provoca la reducción de los niveles de TRAIL-R1/DR4 y TRAIL-R2/DR5 en la superficie celular directamente relacionado con la resistencia a TRAIL de numerosas células tumorales entre las que se encuentran las líneas tumorales de mama (Zhang & Zhang 2008; Akazawa et al. 2009; Zhang et al. 2009). Por esta razón, nos preguntamos si el tratamiento con TGF- β podría estar induciendo la expresión de TRAIL y mediando un proceso de internalización dependiente de ligando, que redujera los niveles de TRAIL-R2/DR5 en la membrana plasmática y con ello la sensibilidad de las células epiteliales de mama a TRAIL.

Analizamos los niveles de RNA mensajero de TRAIL-R2/DR5 y de TRAIL en células control y tratadas con TGF- β durante 24 horas y comprobamos como los niveles de expresión del ligando se inducen significativamente en las células tratadas, mientras que los niveles de receptor permanecen prácticamente invariables (**Figura 38A**). Del mismo modo, observamos como el tratamiento con TGF- β incrementa los niveles de TRAIL proteína (**Figura 38B**).

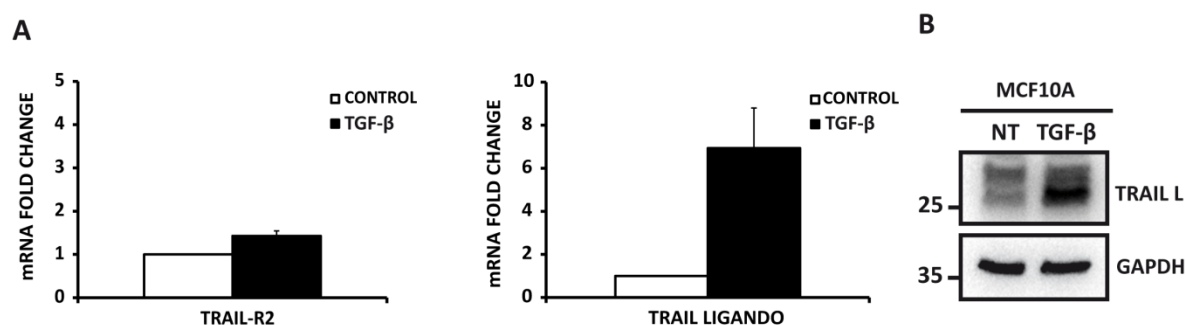
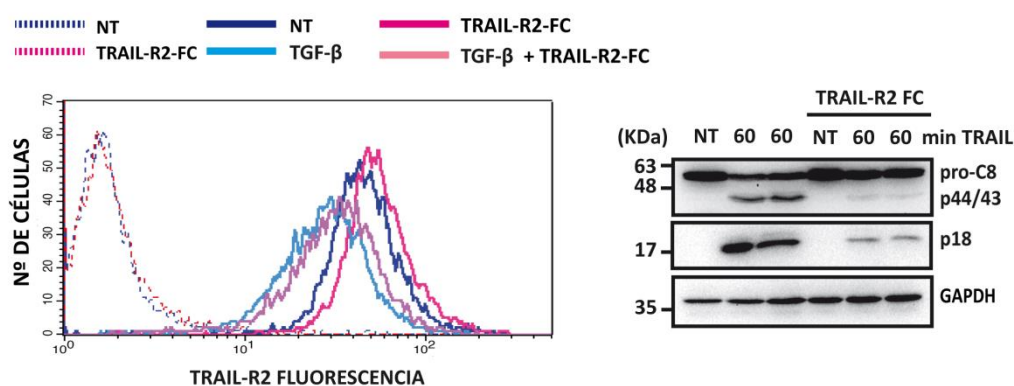


Figura 38 | El tratamiento con TGF β induce la expresión de TRAIL. Células MCF10A fueron tratadas o no con TGF β (5ng/ml) durante 24 horas. **(A)** Los niveles de expresión de RNAm de TRAIL-R2 y TRAIL se analizaron mediante RT-QPCR. Los datos mostrados son la media \pm SEM de tres experimentos independientes. **(B)** La expresión de TRAIL a nivel de proteína se analizó mediante western-blot. La proteína GAPDH se empleó como control de carga. Los datos mostrados son representativos de al menos tres experimentos independientes.

Para estudiar el papel de la inducción de TRAIL mediada por TGF- β en la regulación de los niveles de receptores proapoptóticos en la superficie celular diseñamos dos aproximaciones. Por un lado silenciamos la expresión de TRAIL mediante RNA de interferencia y estudiamos el efecto que provoca en los niveles de TRAIL-R2/DR5 en la superficie celular así como en la sensibilidad a TRAIL de células incubadas con TGF- β . Por otro lado, tratamos las células con la proteína soluble de fusión TRAIL-R2-Fc previo al tratamiento con TGF- β , impidiendo la unión de TRAIL a sus receptores proapoptóticos TRAIL-R1/DR4 y TRAIL-R2/DR5 y analizamos el efecto sobre los niveles de TRAIL-R2/DR5 en la superficie celular.

A



B

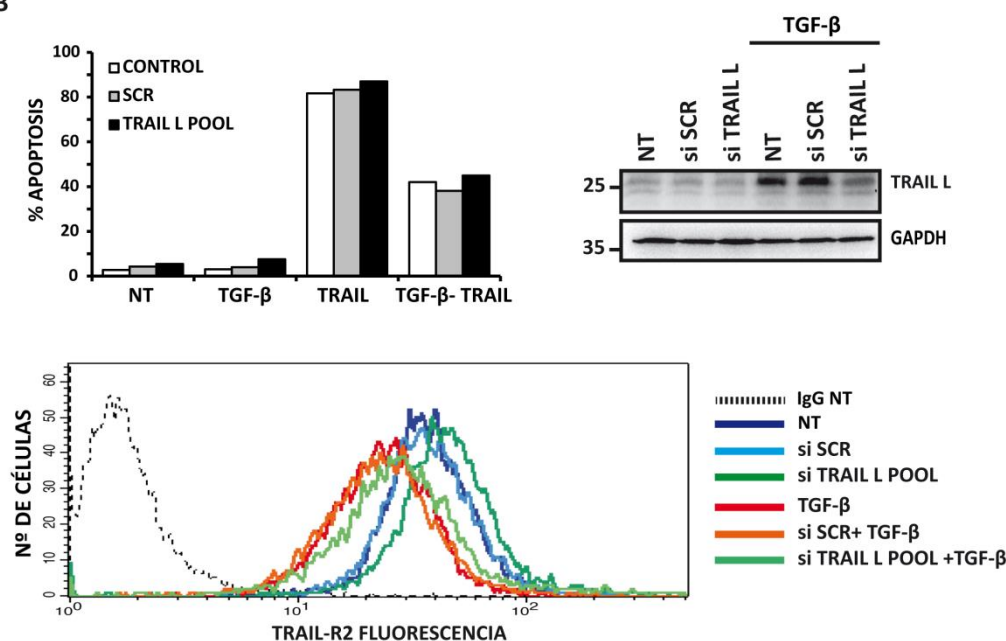


Figura 39 | La internalización del TRAIL-R2 es independiente de ligando. (A) (Panel izquierdo) Células MCF10A fueron tratadas o no con TGF β (5ng/ml) en presencia o en ausencia de TRAIL-R2 Fc durante 24 horas. La expresión en la superficie celular de TRAIL-R2 en los tiempos indicados, se analizó mediante citometría de flujo con el anticuerpo específico TRAIL-R2-PE tal y como se describe en materiales y métodos. Células incubadas con la inmunoglobulina IgG-PE, se emplearon como control de fluorescencia basal. **(Panel derecho)** Células MCF10A incubadas en presencia o en ausencia de TRAIL-R2 Fc, se trataron con TRAIL a 500ng/ml durante los tiempos indicados. El procesamiento de caspasa-8 se analizó mediante western-blot. Los niveles de expresión de GAPDH se emplearon como control de carga. Los datos mostrados son representativos de

tres experimentos independientes. **(B)** Células MCF10A se transfectaron con el oligo de RNA de interferencia frente a un pool de tres oligos de TRAIL, el oligo Scrambled (SCR) o no transfectadas (NT) a una concentración de 50nM durante 24 horas y posteriormente se trataron con TGF- β (5 ng/ml) durante 24 horas, tras las cuales las células se trataron con TRAIL a 250ng/ml durante 15 horas. La apoptosis se midió como el porcentaje de células en subG1 por citometría de flujo, tal y como se describe en materiales y métodos. La expresión de TRAIL a nivel de proteína se analizó mediante western-blot. La proteína GAPH se empleó como control de carga. Los datos mostrados son representativos de al menos tres experimentos independientes. La expresión en la superficie celular de TRAIL-R2 en los tiempos indicados, se analizó mediante citometría de flujo con el anticuerpo específico TRAIL-R2-PE tal y como se describe en materiales y métodos. Células incubadas con la inmunoglobulina IgG-PE, se emplearon como control de fluorescencia basal. Los datos mostrados son representativos de mas de tres experimentos independientes con distintas combinaciones de oligos de RNA de interferencia de TRAIL

Sin embargo, ni la reducción de la expresión de TRAIL mediante siRNA, ni la inhibición con TRAIL-R2-Fc de la acción de TRAIL, previene la disminución de los niveles de TRAIL-R2/DR5 en la membrana plasmática de células incubadas con TGF- β (**Figura 39A, B**), lo que nos permite excluir una internalización del receptor mediada por ligando como mecanismo responsable de la reducción de los niveles de TRAIL-R2/DR5 en la superficie celular.

3.5 TGF- β induce autofagia citoprotectora en células humanas epiteliales de mama.

Otro de los procesos que pueden participar en la regulación de la dinámica de los receptores de TRAIL es la autofagia. En este sentido, se ha descrito que células tumorales de mama resistentes a TRAIL presentan bajos niveles de receptores proapoptóticos TRAIL-R1/DR4 y TRAIL-R2/DR5 y elevados niveles basales de autofagosomas que colocalizan con los receptores de TRAIL en el interior celular. Además, la inhibición farmacológica de la actividad lisosomal, favorece la acumulación de autofagosomas y disminuye los niveles de TRAIL-R1/DR4 y TRAIL-R2/DR5 en la superficie celular incrementando la resistencia a TRAIL de células tumorales de mama (Di et al. 2013).

La autofagia es un conservado proceso catabólico que media la degradación lisosomal de proteínas agregadas y orgánulos dañados con la finalidad de mantener la homeostasis celular y puede ser activada en respuesta a diversos estímulos fisiológicos (Rubinsztein et al. 2012). Durante los últimos años se han identificado diversos mecanismos de regulación bidireccional entre apoptosis y autofagia (Hou et al. 2010; Djavaheri-Mergny et al. 2010; Maiuri et al. 2007) en los que se muestra el efecto citoprotector de la autofagia frente a la apoptosis inducida por tratamientos de diverso origen. Además, recientes estudios otorgan un papel para la autofagia en la resistencia de diversos tipos celulares a los efectos proapoptóticos de TRAIL (Herrero-Martín et al. 2009; Thorburn et al. 2014; Han et al. 2008). Por otro lado, se ha descrito que TGF- β induce autofagia en modelos de carcinomas hepatocelulares y mamarios (Suzuki et al. 2010). Por todo ello, nos preguntamos si la autofagia podría ser responsable de los efectos inhibitorios inducidos por TGF- β en la sensibilidad a TRAIL de células no tumorales epiteliales de mama.

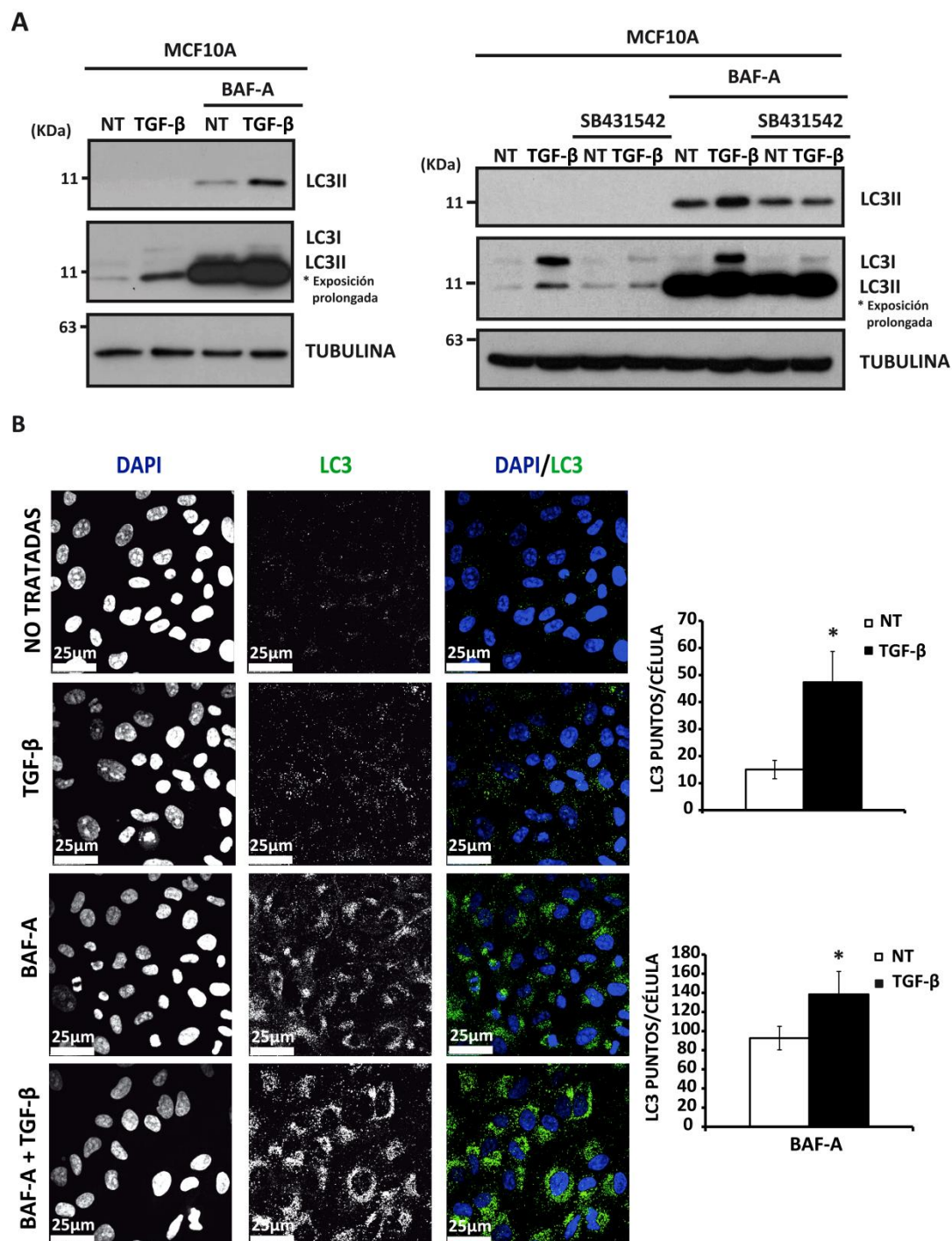


Figura 40 | TGF β induce autofagia en células epiteliales de mama. (A) (Panel izquierdo) Células MCF10A fueron tratadas o no con TGF β (5ng/ml) durante 24 horas, en presencia o en ausencia Bafilomicina-A (400nM) las últimas 4 horas de tratamiento. **(Panel derecho)** Células MCF10A fueron tratadas o no con TGF β (5ng/ml) en presencia o ausencia de el inhibidor de TGF- β R1: SB431542 (0,2 μ M) durante 24 horas y Bafilomicina-A (400nM) las últimas 4 horas de tratamiento. Las isoformas de LC3 se analizaron mediante western-blot. La Tubulina se empleó como control de carga. Los datos mostrados son representativos de tres y dos experimentos independientes respectivamente. **(B)** Imágenes representativas de microscopía confocal de células MCF10A tratadas como en (A) y posteriormente se fijaron y tiñeron para inmunofluorescencia con el anticuerpo LC3. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Barra=25 μ m. La cuantificación (200 células/condición y experimento) del punteados de LC3 se realizó mediante el software metamorph (granularity). Las barras de error representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. *p<0,05.

Examinamos si el tratamiento con TGF- β inducía autofagia en células humanas no tumorales epiteliales de mama, para lo cual determinamos por western blot la aparición de LC3-II, un componente estructural asociado a la membrana del autofagosoma. En la **figura 40A** podemos observar como en células MCF10A, el tratamiento con TGF- β induce un incremento en los niveles de LC3-II, tanto en ausencia como en presencia de bafilomicina-A (Baf-A), un inhibidor de la degradación lisosomal de LC3-II, sugiriendo un incremento del flujo autofágico. Además, al igual que ocurre con la sensibilidad a TRAIL y con los niveles de TRAIL-R2/DR5 en la superficie celular de células tratadas con TGF- β durante 24 horas (**Figura 22B-panel derecho y 29C**), el tratamiento con SB431542 inhibe la acumulación inducida por TGF- β de LC3-II (**Figura 40B**). Para confirmar estos resultados estudiamos la distribución de LC3 por microscopía confocal de células sin tratar y tratadas con TGF- β durante 24 horas y observamos como el tratamiento con TGF- β altera de forma significativa el patrón de tinción de LC3, produciéndose un incremento en el número de puntos por célula en las condiciones tratadas con TGF- β , tanto en presencia como en ausencia de bafilomicina-A e indicando una acumulación de autofagosomas en el interior celular (**Figura 40C**).

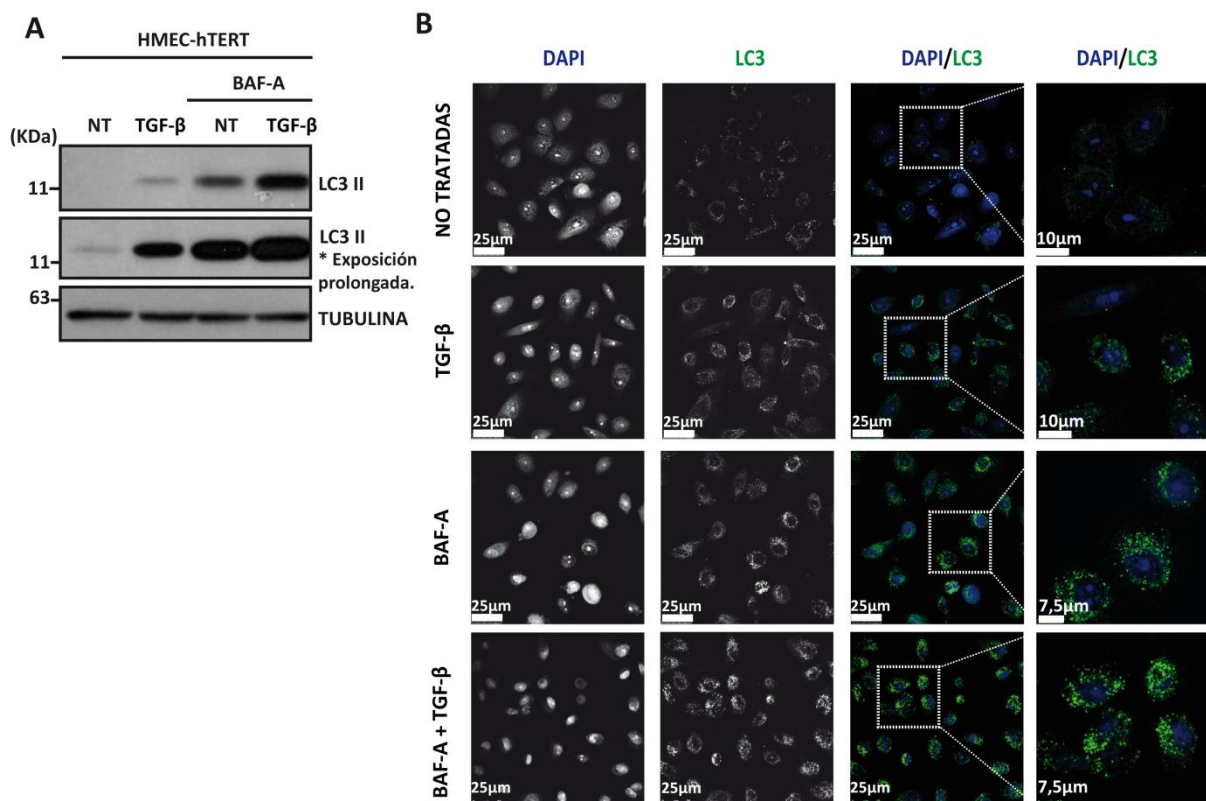


Figura 41 | TGF β induce autofagia en células epiteliales de mama. (A) Células HMEC-hTERT fueron tratadas o no con TGF β (5ng/ml) durante 24 horas, en presencia o en ausencia Bafilomicina-A (400nM) las últimas 4 horas de tratamiento. Las isoformas de LC3 se analizaron mediante western-blot. La Tubulina se empleó como control de carga. Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes respectivamente. **(B)** Imágenes representativas de microscopía confocal de células MCF10A tratadas como en (A) y posteriormente se fijadas y teñidas para inmunofluorescencia con el anticuerpo LC3. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Barra=25 μ m. Barra (zoom)= 7,5 μ m. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

Resultados similares se obtuvieron en células HMEC-hTERT, otra línea epitelial no tumoral de mama. El tratamiento con TGF- β incrementa los niveles de proteína de LC3-II así como el patrón punteado de LC3-II en presencia o no de bafilomicina (**Figura 41A, B**). Por tanto, podemos confirmar que TGF- β induce autofagia en células humanas no tumorales epiteliales de mama.

Con la intención de analizar el papel de la autofagia inducida por TGF- β , diseñamos experimentos de silenciamiento de la proteína de autofagia ATG7 y determinamos si la inhibición de la autofagia inducida por TGF- β ejercía algún efecto sobre los niveles de TRAIL-R2/DR5 en la superficie celular así como sobre la inhibición de la sensibilidad a TRAIL inducida por TGF- β .

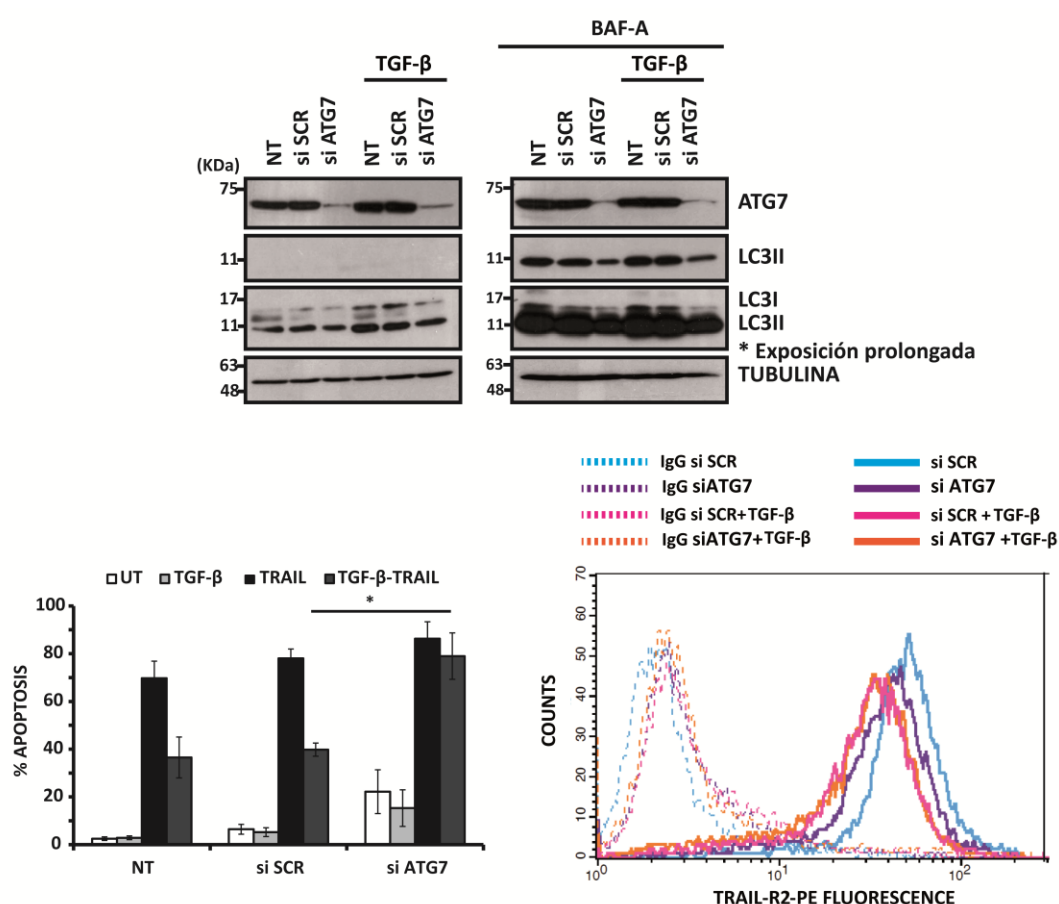


Figura 42 | La autofagia inducida por TGF-beta es citoprotectora. Células MCF10A se transfectaron con el oligo de RNA de interferencia frente a ATG7, el oligo Scrambled (SCR) o no transfectadas (NT) a una concentración de 50nM durante 24 horas y posteriormente se trataron con TGF- β (5 ng/ml) durante 24 horas, (**panel inferior**) tras las cuales las células se trataron con TRAIL a 250ng/ml durante 15 horas. La apoptosis se midió como el porcentaje de células en subG1 por citometría de flujo, tal y como se describe en materiales y métodos. Los histogramas muestran los valores \pm SEM de 3 experimentos independientes. *p<0,05. La expresión en la superficie celular de TRAIL-R2 se analizó mediante citometría de flujo con el anticuerpo específico TRAIL-R2-PE tal y como se describe en materiales y métodos. Células incubadas con la inmunoglobulina IgG-PE, se emplearon como control de fluorescencia basal. Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes. (**Panel superior**) Células MCF10A se transfectaron con el oligo de RNA de interferencia frente a ATG7, el oligo Scrambled (SCR) o no transfectadas (NT) a una concentración de 50nM durante 24 horas y posteriormente se trataron con TGF- β (5 ng/ml) durante 24 horas, en presencia o en ausencia Bafilomicina-A (400nM) las últimas 4 horas de tratamiento. La expresión de ATG7 y LC3 se analizó mediante western-blot. La Tubulina se empleó como control de carga. Los datos mostrados son representativos de al menos tres experimentos independientes.

Los resultados obtenidos mostraron que el silenciamiento de ATG7 bloquea la inducción de autofagia inducida por TGF- β y recupera la sensibilidad de las células MCF10A tratadas con TGF- β a TRAIL. Sin embargo, los niveles de TRAIL-R2/DR5 en la superficie celular de células incubadas con TGF- β no se recuperan (**Figura 42**). En conjunto, estos datos muestran que la activación de autofagia inducida por TGF- β juega un papel necesario en la inhibición de la apoptosis inducida por TRAIL en células no tumorales epiteliales de mama.

Finalmente podemos concluir con que TGF- β impide la sensibilización a TRAIL mediada por EGF de células no tumorales epiteliales de mama a través de la activación de dos mecanismos independientes que implican la disminución en la superficie celular y posterior acumulación intracelular del receptor proapoptótico TRAIL-R2/DR5 y la inducción de autofagia. Ambos mecanismos son necesarios y colaboran en la inhibición por TGF- β de la apoptosis inducida por TRAIL (**Figura 43**).

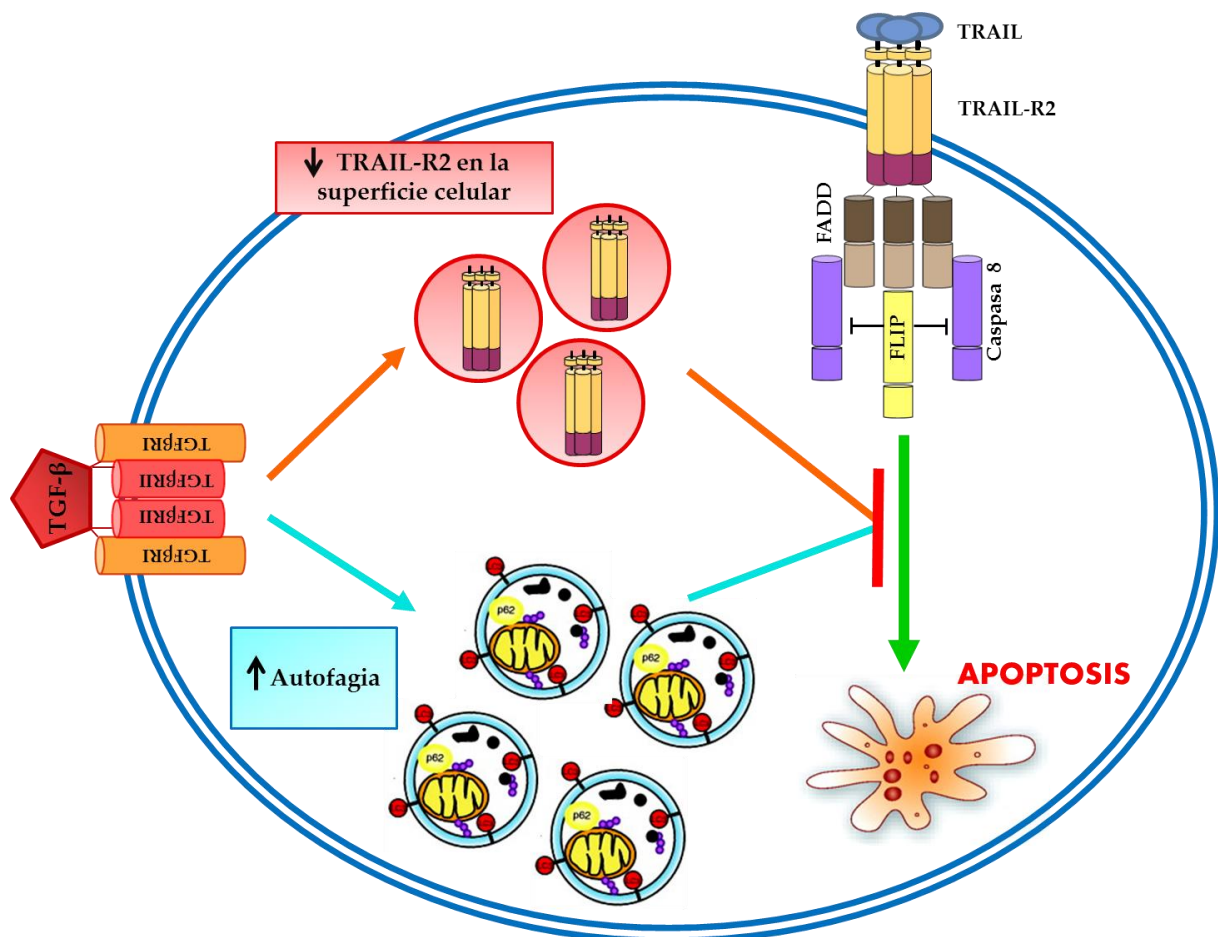


Figura 43 | Papel de TGF- β en la regulación de la apoptosis inducida por TRAIL.

CAPITULO IV: Papel del sistema TRAIL en el destino celular tras estrés en el retículo endoplasmático.

4.1 Líneas tumorales triple negativas son más sensibles a estímulos inductores de estrés en el retículo endoplasmático.

Diversos estímulos tales como la privación de nutrientes, la hipoxia, el estrés oxidativo o las infecciones virales provocan la acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico. Para combatir esta situación, las células poseen rutas de control de calidad que permiten mantener la homeostasis celular en el retículo endoplásmico (RE) y que conocemos como “respuesta a proteínas mal plegadas o UPR”. Sin embargo, en determinadas circunstancias, en función del tiempo y de la intensidad del estrés, la UPR pasa de una fase adaptativa a una fase apoptótica en la cual se ve comprometido el destino celular (Iurlaro & Muñoz Pinedo 2015; Urra et al. 2013).

Se ha descrito que el estrés en el retículo endoplasmático desempeña un papel en inflamación, neurodegeneración, cáncer y enfermedades metabólicas. Por ello, entender como las células responden al estrés en el retículo endoplasmático, resulta fundamental para el desarrollo de nuevas terapias frente a estas enfermedades.

Los tumores de mama triple negativos (TNBC), caracterizados por la ausencia de receptores de estrógenos (ER-), de progesterona (P-) y del receptor de tipo 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), representan el 10-20% de los casos de tumores de mama, con mal pronóstico y un elevado índice de recaída temprana, por lo que es necesaria la búsqueda de nuevas terapias (Schneider et al. 2008).

Recientemente se ha descrito, que las células tumorales de mama triple negativas, que poseen una activación mayor del programa de transición epitelio-mesénquima, son más sensibles a la apoptosis inducida por diferentes estímulos de estrés en el retículo endoplasmático que células tumorales de mama luminales (Feng et al. 2014). Sin embargo, no se ha caracterizado el proceso que media la muerte celular en este modelo. Por ello, y con el objetivo de profundizar en el estudio de la respuesta apoptótica de células tumorales de mama triple negativas decidimos estudiar el mecanismo de apoptosis implicado en la muerte diferencial de líneas tumorales de mama triple negativas frente a líneas tumorales luminales.

En primer lugar evaluamos cual era la sensibilidad a estímulos de estrés en el retículo endoplásmico en diferentes líneas tumorales de mama triple negativas y luminales. Una dosis-respuesta con dos estímulos clásicos de estrés en el RE, tapsigargina y ditiotreitól (DTT), nos muestra como las líneas tumorales de mama triple negativas (en rojo) son más sensibles que las líneas tumorales luminales (en azul) (**Figura 44A, B**).

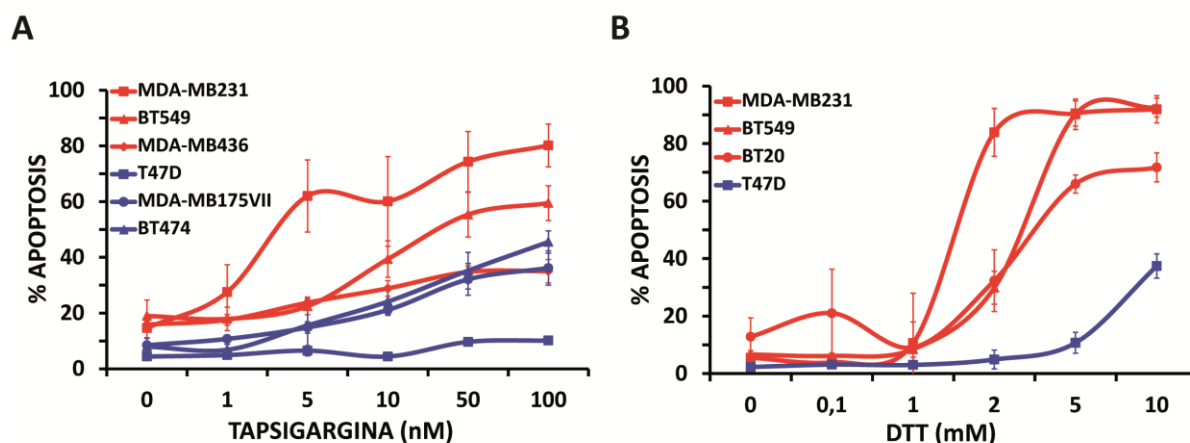


Figura 44: Líneas tumorales triple negativas son más sensibles a estímulos inductores de estrés en el retículo endoplasmático. (A) Las líneas celulares tumorales de mama triple negativas: MDA-MB231, BT549 y MDA-MB436 (curvas rojas) y luminales: T47D, MDA-MB175VII y BT474 (curvas azules) se trataron con las dosis indicadas de tapsigargina durante 72 horas. (B) Las líneas celulares tumorales de mama triple negativas: MDA-MB231, BT549 y BT20 (curvas rojas) y la línea tumoral de mama luminal: T47D (curvas azules) se trataron con las dosis indicadas de ditiotreitól (DTT) durante 72 horas. La apoptosis se midió como el porcentaje de células en subG1 por citometría de flujo tal y como se describe en materiales y métodos. Los histogramas muestran los valores \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes.

Con objeto de profundizar en el mecanismo de muerte inducido por estrés en el retículo endoplasmático, comprobamos si la muerte observada era dependiente de caspasas. Para ello empleamos inhibidores generales de caspasas: Z-VAD-fmk y Q-VD-OPh. El cotratamiento con Z-VAD-fmk y tapsigargina bloqueó significativamente la muerte inducida por estrés en el retículo endoplasmático (RE) en dos líneas tumorales de mama triple negativas, MDA-MB231 y BT549 (**Figura 45A**). De igual modo, el cotratamiento con Q-VD-OPh y Tunicamicina, otro inductor clásico de estrés en el RE, redujo significativamente los niveles de muerte tanto en la línea tumoral MDA-MB231 como en BT549 (**Figura 45B**). Por lo que podemos confirmar que la muerte observada es dependiente de caspasas y por tanto apoptótica.

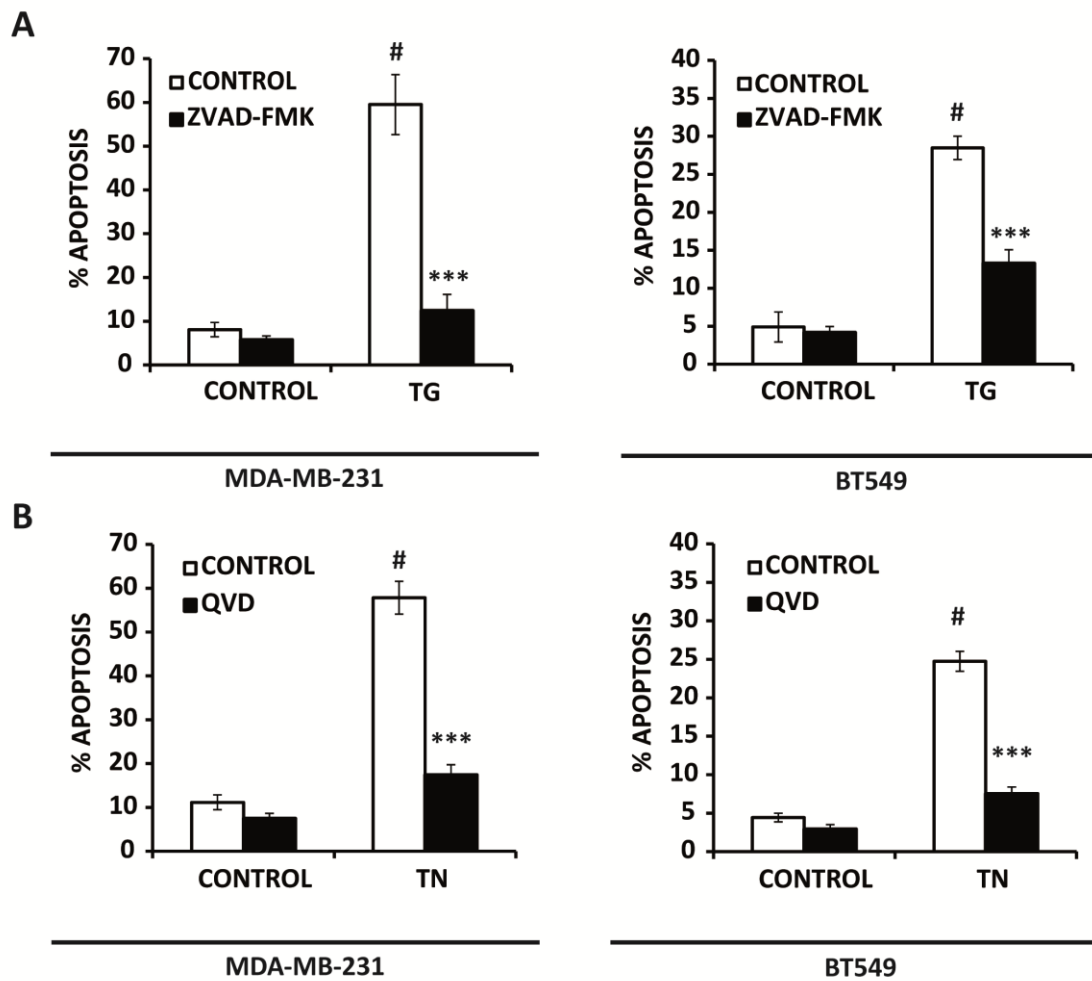


Figura 45: La muerte inducida por estímulos de estrés en el retículo endoplasmático es dependiente de caspasas. (A) Las líneas celulares tumorales de mama triple negativas: MDA-MB231, BT549 se trataron con taspigargina (TG) a dosis de 50 o 100nM respectivamente durante 72 horas en presencia o ausencia de z-VAD-fmk (50μM). **(B)** Las líneas celulares tumorales triple negativas: MDA-MB231, BT549 se trataron con Tunicamicina (TN) a dosis de 1μg/ml durante 72 horas en presencia o ausencia de Q-VD-OPh (20μM). La apoptosis se midió como el porcentaje de células en subG1 por citometría de flujo tal y como se describe en materiales y métodos. Los histogramas muestran los valores +/- SEM de al menos 3 experimentos independientes.

Quisimos analizar la implicación de la ruta intrínseca o mitocondrial en la muerte inducida por estímulos de estrés en el retículo endoplasmático, para lo cual generamos una línea celular MDA-MB231 que sobreexpresaba ectópicamente la proteína antiapoptótica de la familia BCL-2, BCL-XL (231-Bcl-XL) o el vector vacío (231-pbabeØ) (**Figura 46A**). En estas líneas, la apoptosis inducida por tratamiento con taspigargina (**Figura 46B, panel superior**) o con Tunicamicina (**Figura 46B, panel inferior**) disminuyó de forma significativa en la línea MDA-MB231 que sobreexpresaba Bcl-XL.

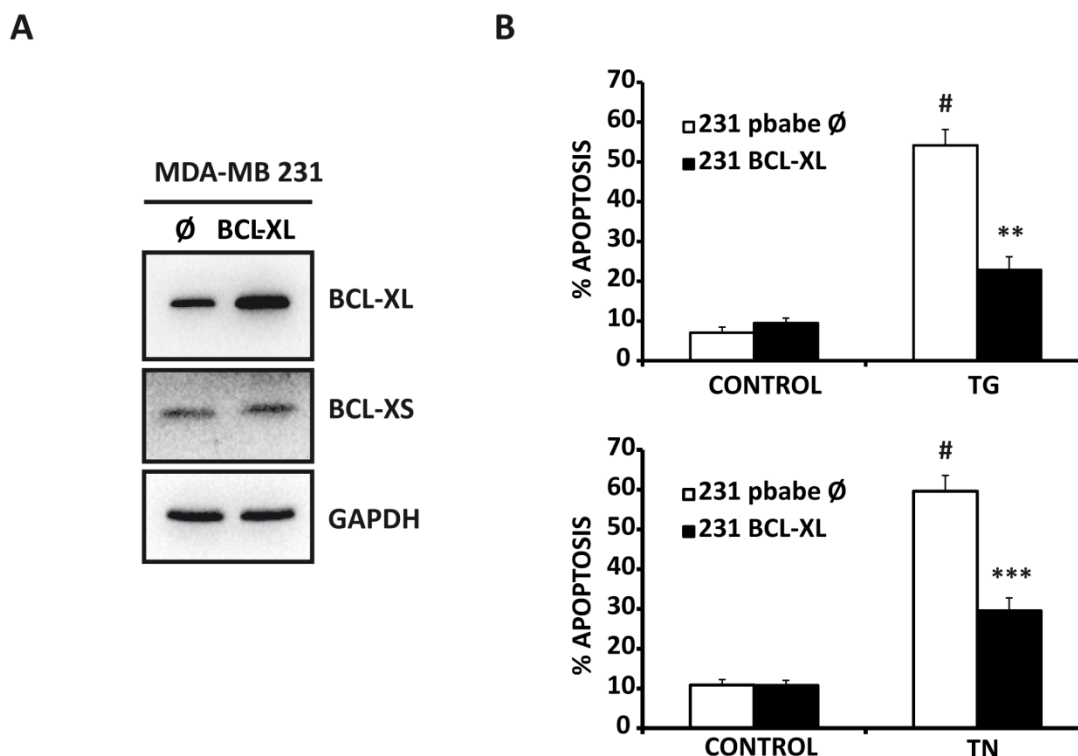


Figura 46: La sobreexpresión de Bcl-XL inhibe la muerte inducida por estímulos de estrés en el retículo endoplasmático.

(A) La sobreexpresión de Bcl-XL se detectó mediante western-blot. Los niveles de GAPDH se emplearon como control de carga. **(B)** La línea tumoral de mama triple negativa: MDA-MB231 que sobreexpresa Bcl-XL (231-Bcl-XL) o el vector vacío (231 pBabeØ) fue tratada con tapsigargina (TG) 100nM (panel superior) o Tunicamicina (TN) 500ng/ml (panel inferior) durante 72 horas. La apoptosis se midió como el porcentaje de células en subG1 por citometría de flujo tal y como se describe en materiales y métodos. Los histogramas muestran los valores \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes.

4.2 La muerte inducida por estímulos de estrés en el retículo endoplasmático no depende exclusivamente de la ruta extrínseca de TRAIL en células tumorales de mama triple negativas.

Para caracterizar el mecanismo diferencial implicado en la muerte celular inducida por estímulos de estrés en el retículo endoplasmático (RE) elegimos la línea tumoral de mama triple negativa MDA-MB231 y como estímulo la tapsigargina.

En líneas tumorales humanas se ha demostrado la implicación del factor de transcripción CHOP en la apoptosis inducida por estrés en el retículo endoplasmático (RE) (Jäger et al. 2012; Iurlaro & Muñoz Pinedo 2015). Entre los numerosos genes diana de CHOP podemos encontrar el gen del receptor proapoptótico de TRAIL, TRAIL-R2/DR5, en el que se ha identificado un potencial sitio de unión de CHOP y cuya inducción en respuesta a estrés en el RE en diversas líneas tumorales está directamente implicada en la apoptosis (Yamaguchi & Wang 2004).

Además, datos previos de nuestro grupo describen el mecanismo molecular por el que células humanas epiteliales de mama que sobreexpresan una forma constitutivamente activa del receptor de ERBB2/Her2 son más sensibles a agentes que inducen estrés en el RE. Esta mayor sensibilidad de las células MCF10A que expresan una forma mutada y constitutivamente activa del oncogén ERBB2/Her2 (MCF10A pNeuT), se debe a una mayor activación de la ruta de PERK-ATF4-CHOP en respuesta a estrés en el RE que promueve el incremento en los niveles de TRAIL-R2/DR5 y la activación proapoptótica de caspasa 8 (Martín-Pérez et al. 2014).

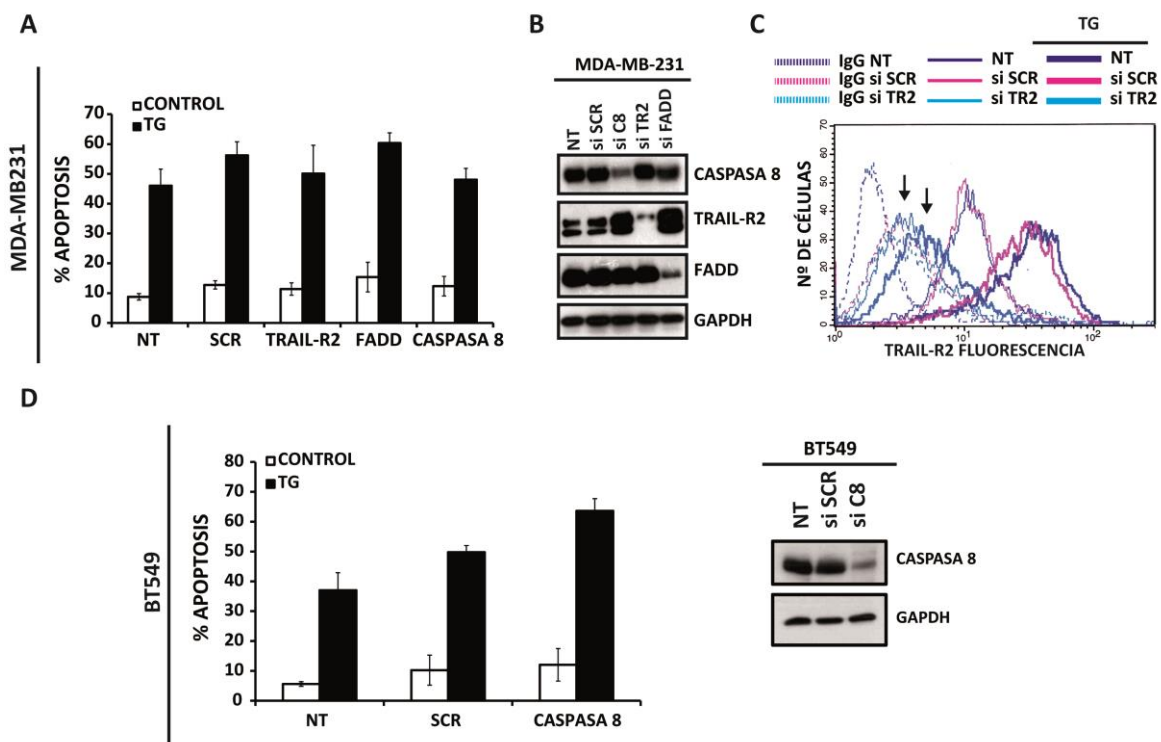


Figura 47: La inhibición de la activación de la ruta extrínseca no es suficiente para bloquear la apoptosis inducida por taspargina en células tumorales triple negativas. (A) Células MDA-MB231 fueron transfectadas con el oligo de interferencia frente a TRAIL-R2/DR5, FADD y caspasa 8, el oligo scrambled (SCR), o no transfectadas (NT) a una concentración de 50nM durante 30 horas tal y como se especifica en materiales y métodos. Tras este tiempo las células fueron tratadas o no con taspargina (TG) a 50nM durante 48 horas. La apoptosis se midió como el porcentaje de células en subG1 por citometría de flujo tal y como se describe en materiales y métodos. Los histogramas muestran los valores +/- SEM de al menos 3 experimentos independientes. (B) Los niveles de expresión de las proteínas caspasa 8, TRAIL-R2/DR5 y FADD se detectaron mediante western-blot tras 30 horas de transfección. Los niveles de GAPDH se emplearon como control de carga. (C) La expresión en la superficie celular de TRAIL-R2 fue analizada por citometría de flujo tras 30 horas de transfección con el anticuerpo específico TRAIL-R2-PE tal y como se describe en materiales y métodos. Células incubadas con la inmunoglobulina IgG-PE se emplearon como control de fluorescencia basal de células transfectadas o no transfectadas (NT). Los datos mostrados son representativos de al menos 3 experimentos independientes. (D) Células BT549 fueron transfectadas con el oligo de interferencia frente a caspasa 8, el oligo scrambled (SCR), o no transfectadas (NT) a una concentración de 50nM durante 30 horas tal y como se especifica en materiales y métodos. Tras este tiempo las células fueron tratadas o no con taspargina (TG) a 100nM durante 72 horas. La apoptosis se midió como el porcentaje de células en subG1 por citometría de flujo tal y como se describe en materiales y métodos. Los histogramas muestran los valores +/- SEM de 3 experimentos independientes.

Por ello, decidimos analizar en nuestro modelo de líneas tumorales de mama triple negativas, el papel de la ruta extrínseca de TRAIL en la apoptosis inducida por estrés en el retículo endoplasmático. Diseñamos experimentos de silenciamiento por RNA de interferencia de las principales proteínas implicadas en la señalización temprana de TRAIL: TRAIL-R2/DR5, FADD y caspasa 8. Sin embargo, el silenciamiento de estas proteínas de la ruta extrínseca de apoptosis no bloqueó de manera significativa la apoptosis inducida por taspigargina en la línea celular tumoral MDA-MB231 (**Figura 47A**), a pesar de reducir considerablemente los niveles de caspasa 8, FADD y TRAIL-R2/DR5 total (**Figura 47B**) y en la superficie celular (**Figura 47C**).

Quisimos corroborar estos resultados y silenciamos mediante RNA de interferencia caspasa 8 en la línea celular BT549, otro modelo de células tumorales de mama triple negativas, observando de nuevo como la reducción en los niveles de caspasa 8 no afectaba a la apoptosis inducida por taspigargina (**Figura 47D**).

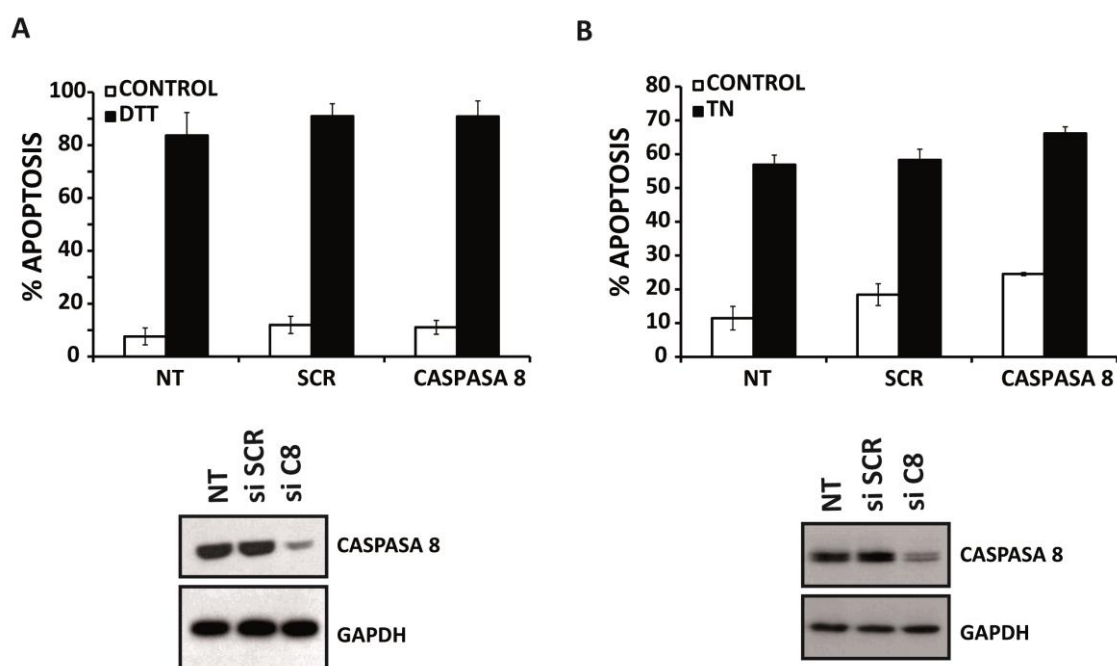


Figura 48: Caspasa 8 no participa en la apoptosis inducida por estrés en el retículo en células tumorales de mama triple negativas. (A) Células MDA-MB231 fueron transfectadas con el oligo de interferencia frente a caspasa 8, el oligo scrambled (SCR), o no transfectadas (NT) a una concentración de 50nM durante 30 horas tal y como se especifica en materiales y métodos. Tras este tiempo las células fueron tratadas o no con ditiotreitól (DTT) a 5mM durante 48 horas. (B) Células MDA-MB231 fueron transfectadas como en (A) y tratadas con Tunicamicina (TN) a 500ng/ml durante 48 horas. La apoptosis se midió como el porcentaje de células en subG1 por citometría de flujo tal y como se describe en materiales y métodos. Los histogramas muestran los valores \pm SEM de 3 experimentos independientes. Los niveles de expresión de la proteína caspasa 8 se detectaron mediante western-blot tras 30 horas de transfección. Los niveles de GAPDH se emplearon como control de carga.

Para excluir un posible efecto específico del tratamiento con taspigargina, determinamos en células MDA-MB231 el efecto del silenciamiento de caspasa 8 en la apoptosis inducida por otros dos estímulos clásicos de estrés en el retículo: ditiotreitól o DTT y Tunicamicina. De nuevo, a pesar de la reducción de los niveles de caspasa 8, la apoptosis inducida por DTT y por Tunicamicina no se vio afectada (**Figura 48A, B**).

Los datos obtenidos hasta el momento sugieren la implicación de un mecanismo apoptótico de respuesta a estrés en el retículo distinto al previamente descrito en células epiteliales de mama MCF10A que sobreexpresan una forma constitutivamente activa del oncogén ERBB2/Her2 (Martín-Pérez et al. 2014), en el que caspasa 8 regulaba la apoptosis inducida por taspigargina. Por esta razón, quisimos profundizar en el mecanismo por el que el estrés en el retículo media la muerte en células tumorales de mama triple negativas.

4.3 La inhibición simultánea de la ruta extrínseca e intrínseca disminuye significativamente la apoptosis inducida por taspigargina en células tumorales de mama triple negativas.

En respuesta a estrés en el retículo endoplasmático y con el objetivo de restaurar la homeostasis celular, se produce la activación de un conjunto de rutas de señalización conocida como respuesta a proteínas mal plegadas o UPR, cuya función principal es la adaptación a la nueva situación de estrés y la supervivencia. Sin embargo, si el estrés no revierte o se prolonga se activa una señalización proapoptótica que induce apoptosis, generalmente mediada por la mitocondria, en las células dañadas (Urrea et al. 2013; Shore et al. 2011).

Resultados previos (**Figura 46**) indicaban la implicación de la mitocondria en la apoptosis inducida por estrés en el retículo endoplasmático, en células tumorales de mama triple negativas. Sin embargo, desconocíamos el mecanismo responsable de la activación de la ruta mitocondrial.

Entre las funciones de la UPR, encontramos la regulación transcripcional de genes implicados en procesos tales como la adaptación al estrés, la supervivencia y en última instancia la muerte celular. Además ha sido ampliamente descrito como la familia de proteínas Bcl-2 juega un papel importante tanto en la adaptación como en la muerte celular inducida por estrés en el RE (Szegezdi et al. 2009). Por esta razón, decidimos determinar mediante análisis por RT-MLPA (Del inglés: *Retro Transcription-Multiplex Ligand Probe-dependent Amplification*) y en colaboración con el grupo del Dr. Joan Gil (Universidad de Barcelona), los niveles de expresión de RNA mensajero de 45 genes implicados en apoptosis en células MDA-MB231 y T47D tratadas o no con taspigargina durante 20 horas.

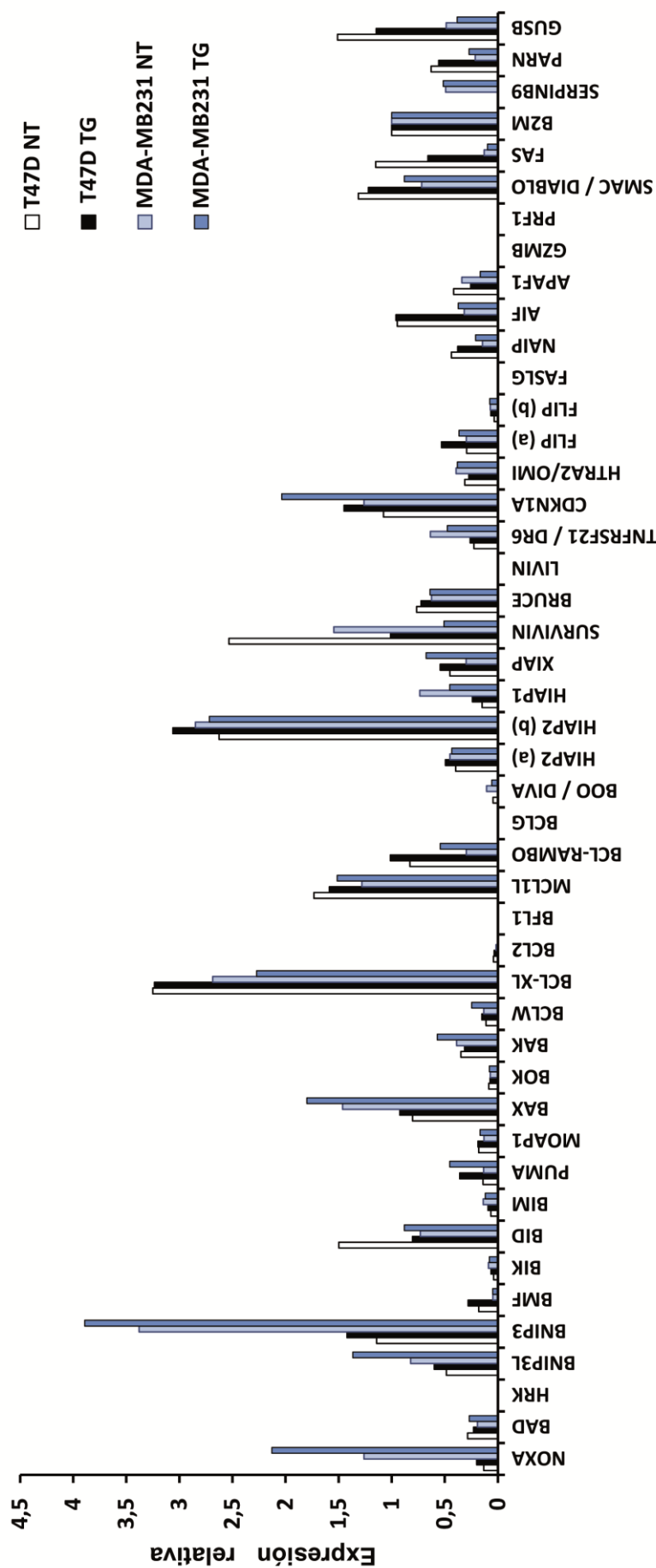


Figura 49: Análisis RT-MLPA en líneas tumorales de mama triple negativas y luminales tras tratamiento con tapsigargina (TG) 100nM durante 20 horas. Se muestra la expresión relativa del mRNA de cada gen normalizado frente a beta-2-microglobulina. Se muestra un gráfico representativo de tres experimentos independientes.

Los resultados obtenidos no muestran apenas variación en la expresión de los RNA mensajeros de proteínas BH3-only en respuesta a taspigargina, salvo en el caso de Noxa y Puma. Por otro lado, cabe destacar que los niveles basales de expresión de mRNA de genes proapoptóticos como Noxa, BNIP3 y BAX se encuentran claramente incrementados en células sensibles MDA-MB231 frente a células resistentes T47D (**Figura 49**).

Quisimos confirmar a nivel de proteína los datos de RNA mensajero de Noxa observados en el RT-MLPA. Tal y como se puede observar en la **Figura 50A**, las células triple negativas MDA-MB231 expresan unos niveles basales de Noxa muy elevados en comparación con la línea tumoral de mama luminal T47D, en la que no observamos expresión de la proteína ni en condiciones basales ni en respuesta al tratamiento con taspigargina.

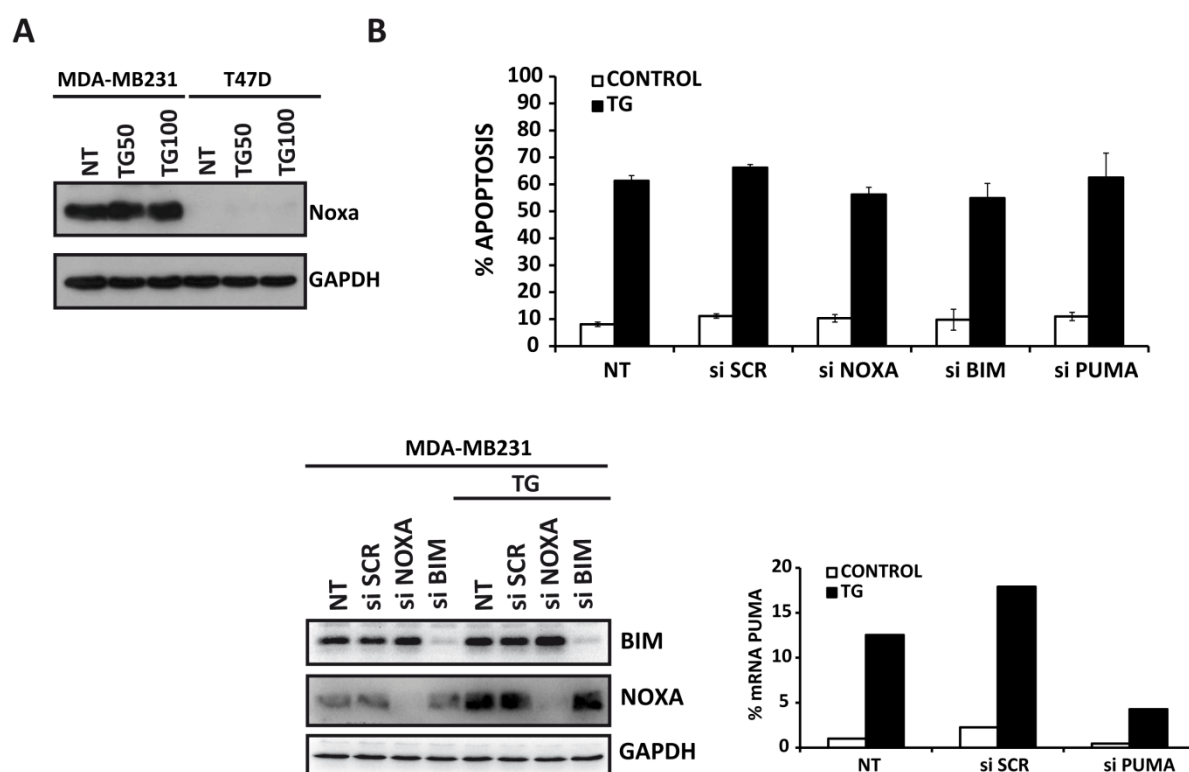


Figura 50: El silenciamiento de las proteínas BH3-only Noxa, Bim o Puma no es suficiente para inhibir la apoptosis inducida por taspigargina. (A) Células MDA-MB231 y T47D fueron tratadas con taspigargina (TG) a dosis de 50 y 100 nM o no tratadas (NT) durante 20 horas. Transcurrido ese tiempo los niveles de proteína de Noxa fueron analizados mediante western-blot tal y como se describe en materiales y métodos. Los niveles de GAPDH se emplearon como control de carga. (B) Células MDA-MB231 fueron transfectadas con oligos de interferencia frente a Noxa, Bim o Puma, el oligo scrambled (SCR), o no transfectadas (NT) a una concentración de 50nM durante 30 horas tal y como se especifica en materiales y métodos. Tras este tiempo las células fueron tratadas o no con taspigargina (TG) a una dosis de 50nM durante 48 horas. Los histogramas muestran los valores \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. Los niveles de expresión de las proteínas Noxa y Bim se detectaron mediante western-blot tras 30 horas de transfección. Los niveles de GAPDH se emplearon como control de carga. Los niveles de RNA mensajero de Puma se detectaron mediante RT-QPCR.

Dados los resultados anteriores, decidimos realizar experimentos de silenciamiento mediante RNA de interferencia en células MDA-MB231 frente a las 3 proteínas BH3-only principalmente implicadas en muerte celular inducida por estrés en el retículo endoplasmático: Noxa, Bim y Puma (Urrea et al. 2013; Iurlaro & Muñoz Pinedo 2015). Sin embargo, y a pesar de la significativa reducción en los niveles de las proteínas diana, no observamos efecto inhibitorio alguno sobre la apoptosis inducida por taspigargina (**Figura 50B**). En conjunto todos estos resultados sugieren que la activación por estrés en el retículo endoplasmático de la ruta apoptótica mitocondrial en células tumorales de mama triple negativas no depende de manera exclusiva de la upregulación de una proteína BH3-only o de la reducción en la expresión de una proteína antiapoptótica Bcl-2.

Buscando el posible mecanismo responsable de la apoptosis inducida por taspigargina en células tumorales de mama triple negativas, diseñamos estrategias de inhibición de distintos eventos que se ha descrito pueden estar participando en la muerte inducida por estrés en el retículo endoplasmático.

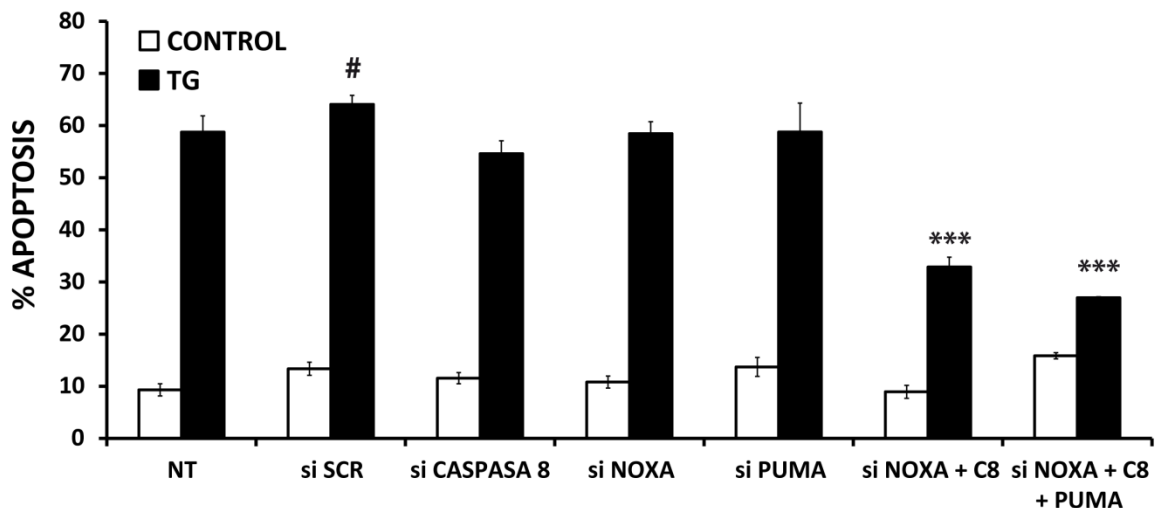
Se sabe que PERK, una quinasa transmembrana del retículo endoplasmático fosforila eIF2 α (factor de iniciación eucariótico 2 α), bloqueando la iniciación de la traducción de proteínas y reduciendo así la carga proteica en el RE. Sin embargo, aunque la traducción general de proteínas se inhibe, se permite e incrementa la traducción de ciertos transcritos, entre los que encontramos a ATF4 que induce a su vez genes implicados en el metabolismo de aminoácidos, la respuesta a estrés y la secreción de proteínas con la finalidad de recuperar la homeostasis celular. Además ATF4 induce un segundo factor de transcripción: CHOP implicado en la apoptosis inducida por estrés en el RE (Jäger et al. 2012). El mecanismo molecular que explica el papel proapoptótico de CHOP, implica en parte la regulación transcripcional de diversos genes diana entre los que se encuentra el gen de la fosfatasa GADD34. El incremento de expresión de GADD34 lleva a la defosforilación de fosfo-eIF2 α , favoreciendo la activación de la síntesis global de proteínas y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que conducirá a una situación de proteotoxicidad (Urrea et al. 2013).

Una de las hipótesis que nos planteamos fue si la acumulación de proteínas mal plegadas como consecuencia de un tratamiento prolongado con taspigargina podría estar siendo la responsable directa de la apoptosis observada. Para ello diseñamos experimentos con el inhibidor de la fosfatasa GADD34: salubrinal. Sin embargo, el tratamiento de las células MDA-MB231 con taspigargina en presencia de salubrinal no redujo los niveles de apoptosis (*datos no mostrados*).

En la misma línea, nos planteamos si la apoptosis observada en estas células en respuesta a estímulos de estrés en el RE podría ser debida a un incremento en los niveles de ROS. Pero de nuevo, el tratamiento de células MDA-MB231 en presencia de N-acetil-cisteína (NAC), antioxidante que

disminuye las especies reactivas de oxígeno y el estrés oxidativo, no redujo los niveles de muerte celular (*datos no mostrados*). De igual modo inhibimos mediante inhibidores específicos las rutas de mTOR, MAPK/ERK, PI3K/AKT y p38 y no observamos una inhibición significativa de la muerte inducida por estrés (*datos no mostrados*), lo que sugiere que ninguna de estas rutas participa en la regulación de la apoptosis inducida por taspigargina en células tumorales de mama triple negativas.

A



B

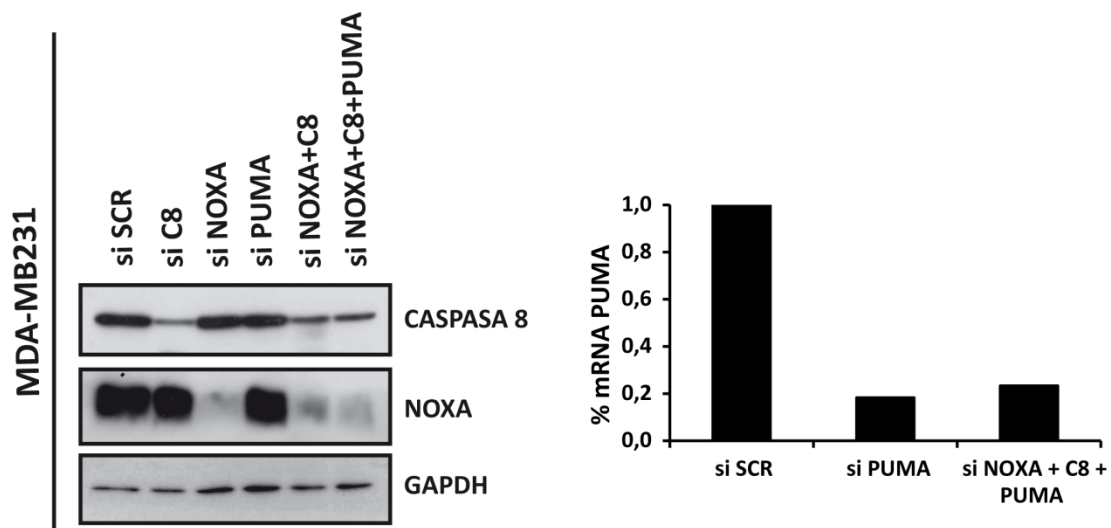


Figura 51: La muerte por estrés en el RE depende de la activación de la ruta extrínseca y la intrínseca. (A) Células MDA-MB231 fueron transfectadas con oligos de interferencia frente a caspasa 8, Noxa y Puma, el oligo scrambled (SCR), o no transfectadas (NT) a una concentración de 100nM durante 30 horas tal y como se especifica en materiales y métodos. Tras este tiempo las células fueron tratadas o no con taspigargina (TG) a una dosis de 50nM durante 48 horas. Los histogramas muestran los valores \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. **(B) (panel izquierdo)** Los niveles de expresión de las proteínas caspasa 8 y Noxa se detectaron mediante western-blot tras 30 horas de transfección. Los niveles de GAPDH se emplearon como control de carga. Los niveles de RNA mensajero de Puma se detectaron mediante RT-QPCR **(Panel derecho)**.

Finalmente y dado que, individualmente, ninguna de las rutas principales de señalización de apoptosis parecían estar involucradas en la regulación de la muerte celular por estrés en el RE, decidimos inhibir la activación de las rutas intrínseca y extrínseca simultáneamente. Para ello, diseñamos experimentos de silenciamiento mediante RNA de interferencia de la proteína caspasa 8 y de las proteínas BH3-only Noxa y Puma en células MDA-MB231. Tal y como habíamos observado previamente, la inhibición de caspasa 8, Noxa o Puma por separado tan solo inhibe ligeramente la apoptosis inducida por taspigargina. Sin embargo, la inhibición conjunta de la expresión de Noxa y caspasa 8 consiguió bloquear de forma significativa los niveles de muerte celular, siendo estos incluso ligeramente menores cuando inhibimos simultáneamente las 3 proteínas (**Figura 51**).

En conjunto, estos resultados sugieren que en la apoptosis inducida por estímulos de estrés en el RE en células tumorales de mama triple negativas se produce una activación tanto de la ruta intrínseca como de la extrínseca, siendo necesaria la inhibición simultánea de ambas para bloquear la apoptosis.

4.4 Papel de los sensores de la UPR en la apoptosis inducida por estrés en el retículo endoplasmático en células tumorales de mama triple negativas.

Con objeto de profundizar en el mecanismo subyacente a esta sensibilidad diferencial al estrés en el retículo endoplasmático, quisimos comprobar si la respuesta de UPR tras el tratamiento con agentes inductores de estrés era la misma en líneas tumorales de mama triple negativas frente a luminales. Para ello, estudiamos la respuesta a taspigargina de los dos sensores de la UPR principalmente implicados en la regulación del destino celular tras estrés en el RE: PERK e Ire1 α (Walter et al. 2011).

En primer lugar, analizamos la actividad de la ruta de PERK/ATF4/CHOP en células tumorales triple negativas MDA-MB231 y en células tumorales luminales T47D, tras tratamiento con taspigargina. Observamos cómo en células MDA-MB231 la expresión de ATF4, así como la expresión de su gen diana CHOP a nivel de proteína, se encontraba significativamente incrementada en comparación con lo que se observaba en células T47D, tras estrés en el retículo endoplasmático (**Figura 52A**). A continuación determinamos la activación de la ruta de Ire1 α , medida como el procesamiento del mRNA que codifica el factor de transcripción XBP1_u (*del inglés X-box-binding protein 1*) para generar un factor de transcripción activo XBP1_s. Tal y como se puede observar en la **figura 52B**, en células MDA-MB231 se produce una fuerte activación inicial de la ruta de Ire1 α que va disminuyendo conforme se prolonga el estrés en el retículo endoplasmático, tal y como se ha descrito para otros sistemas celulares (Lin et al. 2007). En contraste, en células T47D no se produce procesamiento alguno del factor de transcripción XBP1_u.

Confirmamos, por tanto, que se está produciendo una activación diferencial de la UPR en células tumorales epiteliales de mama, por lo que el siguiente paso fue analizar el papel de la activación de estas rutas, en la apoptosis inducida por agentes que provocan estrés en el retículo endoplasmático.

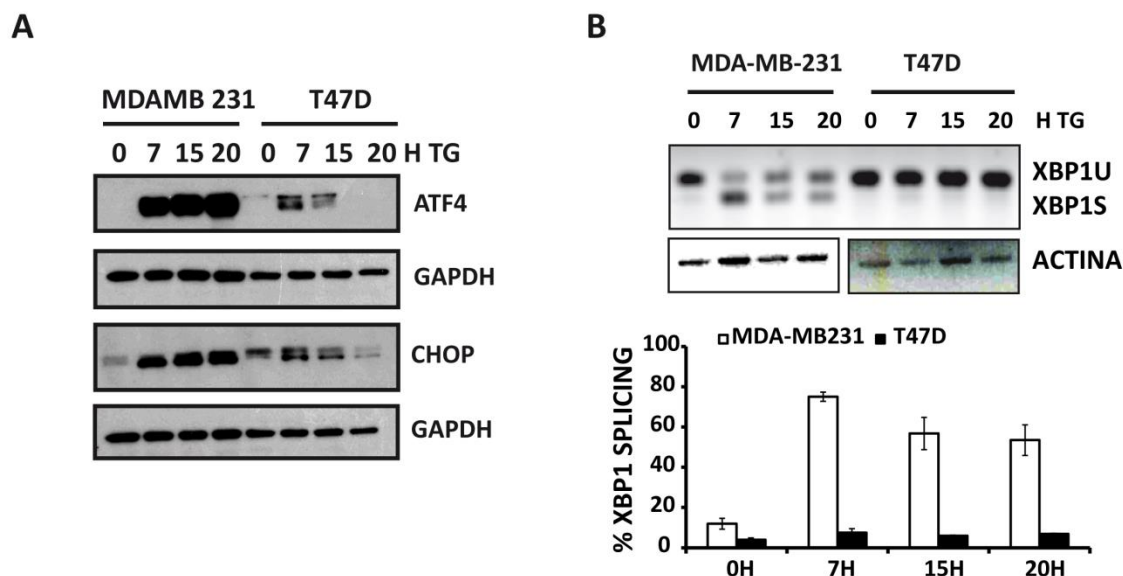


Figura 52: Activación diferencial de la UPR en células tumorales de mama triple negativas. (A) Células MDA-MB231 y T47D fueron tratadas con tunicamigina (TG) a una dosis de 100nM durante 7, 15 y 20 horas. Transcurrido ese tiempo los niveles de expresión de las proteínas ATF4 y CHOP se detectaron mediante western-blot. Los niveles de GAPDH se emplearon como control de carga. (B) Células MDA-MB231 y T47D fueron tratadas como en (A) y los niveles de procesamiento de XBP1 (XBP1s) fueron analizados por RT-PCR y posteriormente cuantificados con respecto a XBP1u. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos independientes.

Para ello, procedimos a bloquear mediante silenciamiento por RNA de interferencia cada uno de los sensores de la UPR y analizar la apoptosis inducida por tunicamigina. En primer lugar, determinamos la participación de la ruta de PERK en la apoptosis inducida por estrés en el RE. Silenciamos las proteínas ATF4 y CHOP y tratamos las células MDA-MB231 con tunicamigina. Sin embargo, a pesar de que el silenciamiento redujo considerablemente los niveles de ambas proteínas no se observó efecto en los niveles de apoptosis inducida por tunicamigina (**Figura 53A**). A continuación silenciamos la ruta de Ire1, que del mismo modo que en el caso anterior y pese a bloquear casi por completo el procesamiento de XBP1_u, no supuso inhibición alguna de la apoptosis inducida por tunicamigina (**Figura 53B**). En este sentido y basándonos en datos previos publicados en la literatura que sugerían que el papel proapoptótico de Ire1 α , podía estar mediado en parte por la inducción de JNK (Jäger et al. 2012), inhibimos la actividad de JNK con un inhibidor específico en células MDA-MB231 tratadas y sin tratar con tunicamigina, sin observar una reducción en los niveles de apoptosis inducidos por estrés en el RE (*datos no mostrados*). Por último, silenciamos el tercer sensor de la UPR, ATF6 sin obtener una reducción significativa de la apoptosis inducida por tunicamigina (**Figura 53C**).

Dados estos resultados, se diseñaron también experimentos para silenciar simultáneamente la ruta de PERK e IRE1 que tampoco consiguieron bloquear la apoptosis inducida por estrés en el RE (*datos no mostrados*).

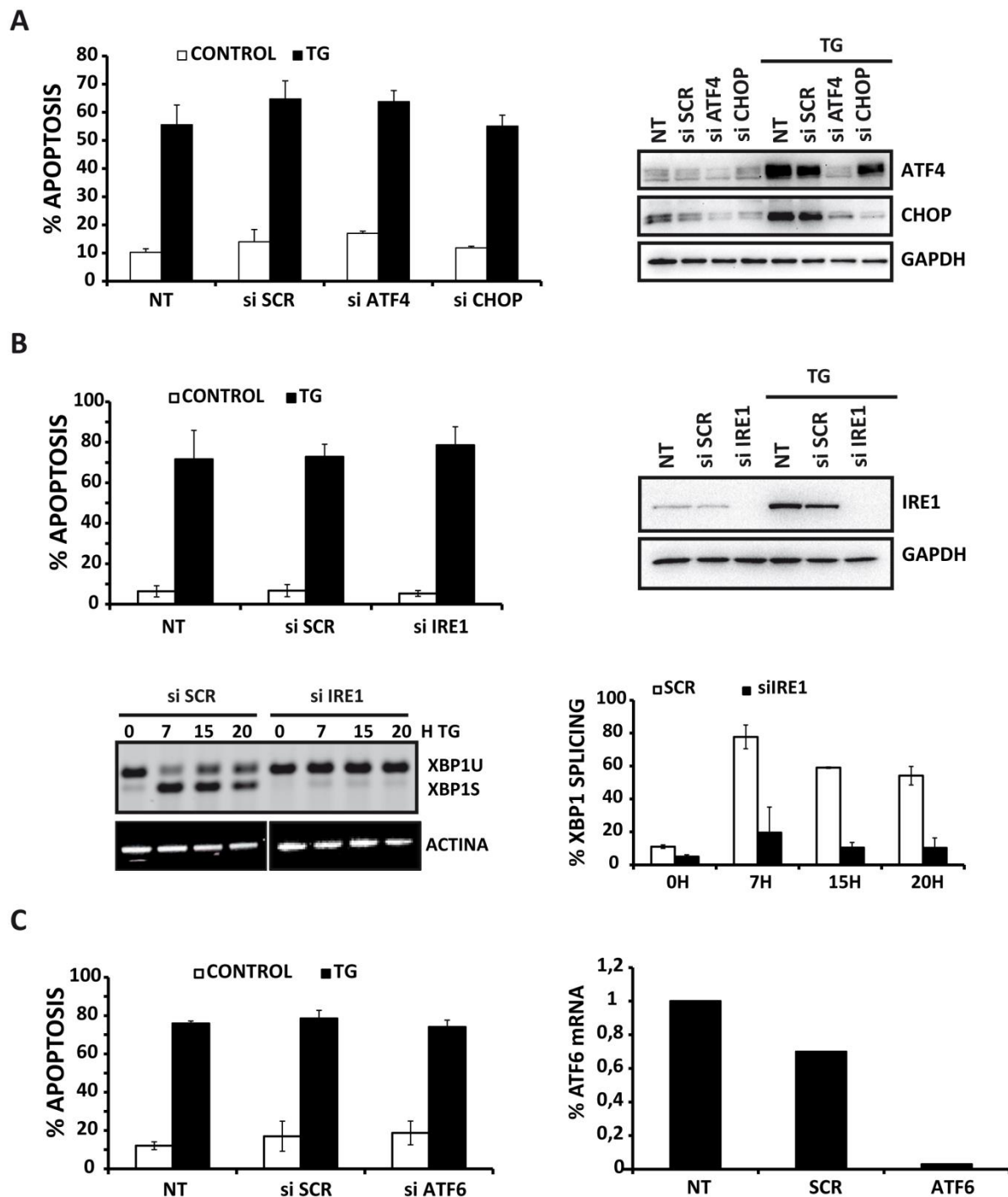


Figura 53: Papel de la UPR en la apoptosis inducida por estrés en el retículo endoplasmático. (A) Células MDA-MB231 fueron transfectadas con el oligo de interferencia frente a ATF4 y CHOP, el oligo scrambled (SCR), o no transfectadas (NT) a una concentración de 50nM durante 30 horas tal y como se especifica en materiales y métodos. Tras este tiempo las células fueron tratadas o no con taspigargina (TG) a 50nM durante 48 horas. La apoptosis se midió como el porcentaje de células en subG1 por citometría de flujo tal y como se describe en materiales y métodos. Los histogramas muestran los valores \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. Los niveles de expresión de las proteínas ATF4 y CHOP se detectaron

mediante western-blot tras 30 horas de transfección. Los niveles de GAPDH se emplearon como control de carga. **(B)(Panel superior)** Células MDA-MB231 fueron transfectadas con el oligo de interferencia frente a Ire1, el oligo scrambled (SCR), o no transfectadas (NT) y se procedió del mismo modo que en (A). Los niveles de expresión de la proteína Ire1 se detectaron mediante western-blot tras 30 horas de transfección. Los niveles de GAPDH se emplearon como control de carga. **(Panel inferior)** Células MDA-MB231 se transfectaron como en (B) y se trataron con taspigargina a 50nM durante 7,15 y 20 horas. Transcurrido ese tiempo los niveles de procesamiento de XBP1 (XBP1s) fueron analizados por RT-PCR y posteriormente cuantificados con respecto a XBP1u. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos independientes. **(C)** Células MDA-MB231 fueron transfectadas con el oligo de interferencia frente a ATF6, el oligo scrambled (SCR), o no transfectadas (NT) y se procedió del mismo modo que en (A). Los niveles de RNA mensajero de ATF6 se detectaron mediante RT-qPCR. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

Estos resultados junto con los datos expuestos anteriormente que señalaban la necesidad de inhibir simultáneamente las rutas apoptóticas intrínseca y extrínseca **(Figura 51)** nos hicieron pensar, que quizá la UPR inducida por taspigargina en células tumorales de mama triple negativas, podría estar participando tan solo en la regulación de una de las dos vías. Razón por la cual, su bloqueo no supone una reducción significativa en la apoptosis inducida por estrés en el retículo endoplasmático.

Numerosas evidencias confirman el papel crucial de la ruta de PERK/ATF4/CHOP en la muerte celular inducida por estrés in vitro e in vivo (Iurlaro & Muñoz Pinedo 2015). Se ha descrito que ATF4 puede incrementar los niveles de Noxa y mediar de este modo la apoptosis en muchos sistemas, entre ellos, la muerte celular por privación de nutrientes o por tratamiento con el inhibidor de la glicosilación: 2-deoxiglucosa (Ramírez-Peinado et al. 2011). Por otro lado, también se ha descrito que la ruta de PERK/ATF4/CHOP induce el incremento en los niveles de TRAIL-R2/DR5 y la activación de caspasa 8 (Martín-Pérez et al. 2014; Yamaguchi & Wang 2004).

Por ello y para profundizar en el papel de la UPR en la regulación de la apoptosis inducida por taspigargina en células tumorales de mama triple negativas, diseñamos experimentos de silenciamiento mediante RNA de interferencia combinando la inhibición de la ruta de PERK con proteínas implicadas en la ruta apoptótica intrínseca y extrínseca. De este modo, silenciamos en células MDA-MB231, las proteínas ATF4 y caspasa 8 por separado y en combinación sin obtener inhibición alguna de la apoptosis inducida por taspigargina **(Figura 54A)**, lo que sugiere que la ruta de PERK no está participando en la activación de la ruta intrínseca. Silenciamos entonces las proteínas ATF4 y Noxa y observamos como la inhibición de la expresión de Noxa y ATF4 por separado no afecta a la sensibilidad de las células MDA-MB231 a taspigargina. Sin embargo la inhibición conjunta de ambas proteínas reduce significativamente la apoptosis inducida por estrés en el RE **(Figura 54B)**. Estos resultados confirman la necesidad de inhibir ambas vías para bloquear la apoptosis inducida por taspigargina y sugieren que la ruta de PERK/ATF4/CHOP podría estar participando en la regulación de la ruta apoptótica extrínseca, puede que a través del incremento en los niveles de TRAIL-R2/DR5 y de la consiguiente activación de caspasa 8.

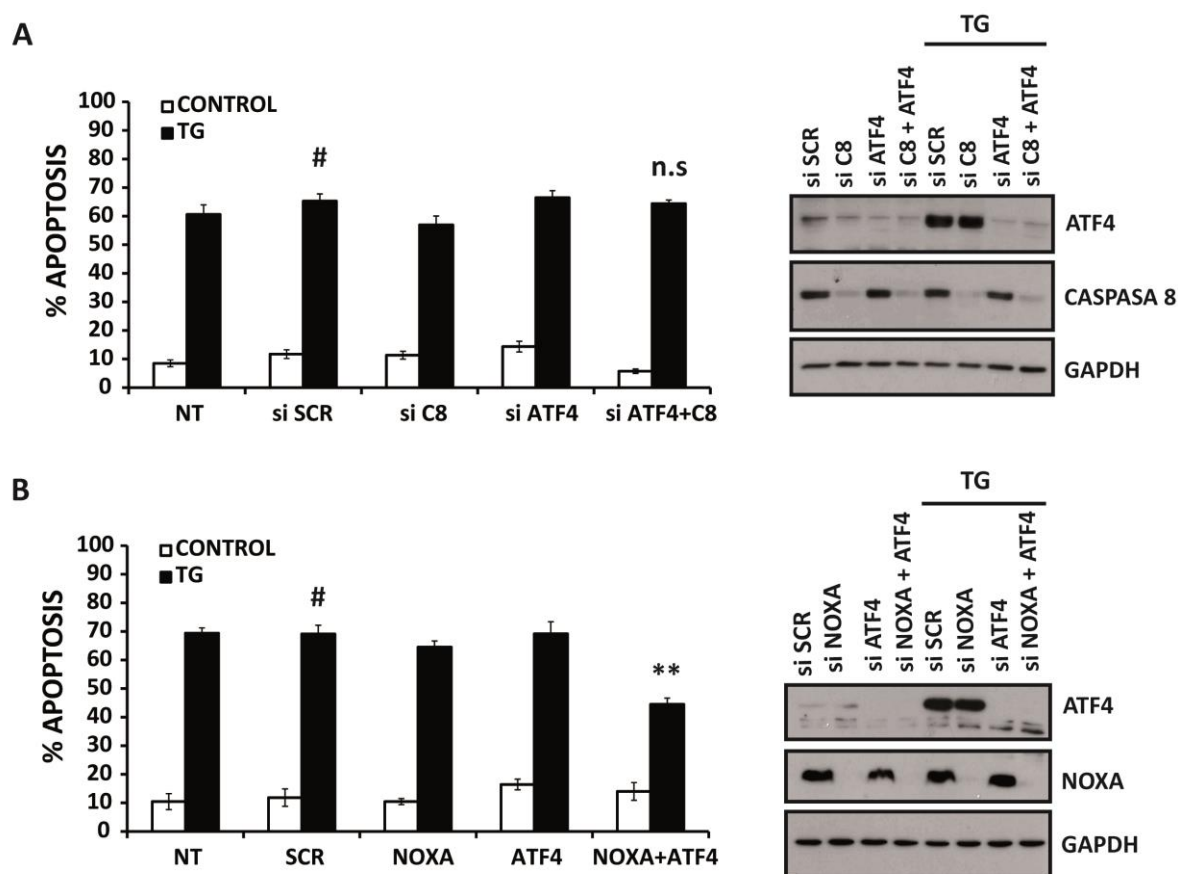


Figura 54: Papel de ATF4 en la apoptosis inducida por taspargarina. (A) Células MDA-MB231 fueron transfectadas con el oligo de interferencia frente a ATF4 y caspasa 8 (C8), el oligo scrambled (SCR), o no transfectadas (NT) a una concentración de 100nM durante 30 horas tal y como se especifica en materiales y métodos. Tras este tiempo las células fueron tratadas o no con taspargarina (TG) a 50nM durante 48 horas. La apoptosis se midió como el porcentaje de células en subG1 por citometría de flujo tal y como se describe en materiales y métodos. Los histogramas muestran los valores \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. Los niveles de expresión de las proteínas ATF4 y caspasa 8 se detectaron mediante western-blot tras 30 horas de transfección. Los niveles de GAPDH se emplearon como control de carga. **(B)** Células MDA-MB231 fueron transfectadas con el oligo de interferencia frente a ATF4 y Noxa, el oligo scrambled (SCR), o no transfectadas (NT) e igual que en (A). Los histogramas muestran los valores \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. Los niveles de expresión de las proteínas ATF4 y Noxa se detectaron mediante western-blot tras 30 horas de transfección. Los niveles de GAPDH se emplearon como control de carga.

Para confirmar esta hipótesis, determinamos en primer lugar, si el tratamiento con taspargarina incrementaba los niveles de TRAIL-R2/DR5 y observamos cómo, en modelos de células tumorales de mama triple negativas: MDA-MB231 y BT549, el tratamiento con taspargarina induce la expresión del receptor TRAIL-R2/DR5 de TRAIL en la superficie celular así como a nivel de proteína total. Sin embargo, este incremento no se observó en la línea tumoral de mama luminal T47D (**Figura 55A, B**). Por último, diseñamos experimentos de silenciamiento mediante RNA de interferencia frente a la proteína ATF4 que demostraron como en células MDA-MB231, el incremento en los niveles de expresión de TRAIL-R2/DR5 en respuesta a un tratamiento con taspargarina se encuentra regulado por el factor de transcripción ATF4 (**Figura 55C**).

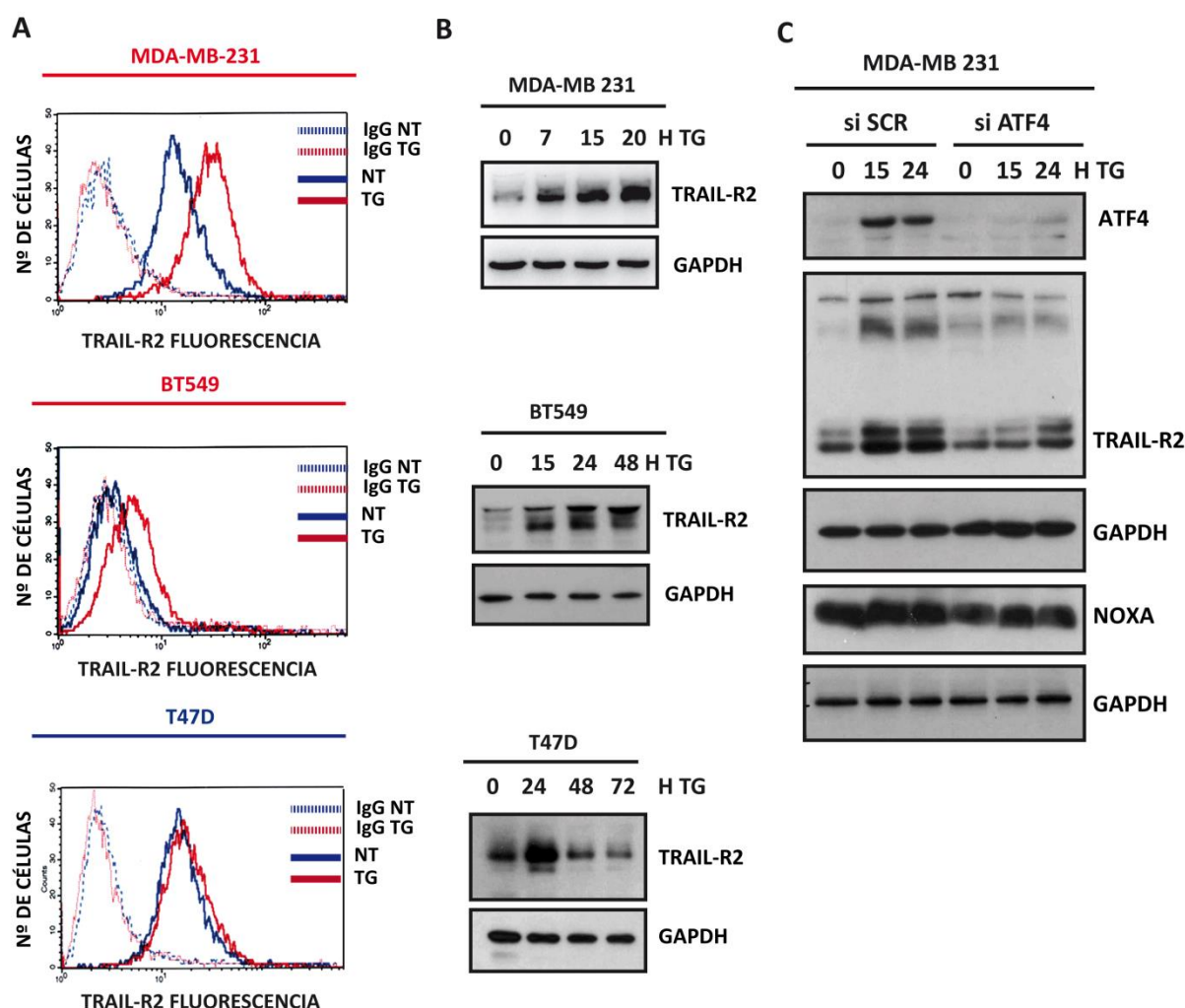
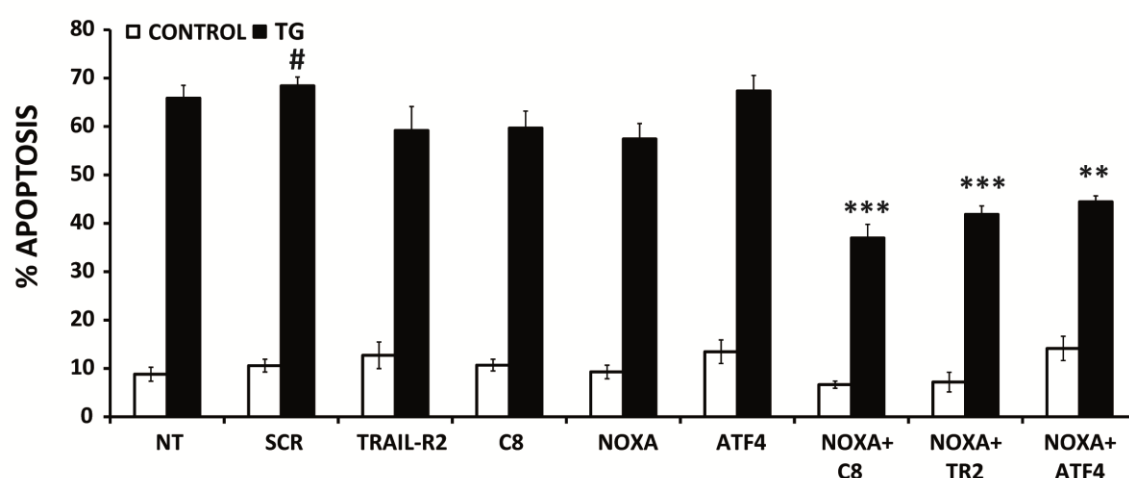


Figura 55: Papel de ATF4 en la apoptosis inducida por taspargina. (A) Células MDA-MB231, BT549 y T47D fueron tratadas o no (NT) con taspargina (TG) a una dosis de 100nM durante 15 horas. Transcurrido ese tiempo la expresión en la superficie celular de TRAIL-R2 fue analizada por citometría de flujo con el anticuerpo específico TRAIL-R2-PE tal y como se describe en materiales y métodos. Células incubadas con la inmunoglobulina IgG-PE se emplearon como control de fluorescencia basal. Los datos mostrados son representativos de al menos 3 experimentos independientes. **(B)** Células MDA-MB231, BT549 y T47D fueron tratadas con taspargina (TG) a 100nM durante los tiempos indicados. Transcurrido ese tiempo se detectaron los niveles de expresión de TRAIL-R2/DR5 mediante western-blot. Los niveles de GAPDH se emplearon como control de carga. Los datos mostrados son representativos de al menos 3 experimentos independientes. **(C)** Células MDA-MB231 fueron transfectadas con el oligo de interferencia frente a ATF4 o el oligo scrambled (SCR), a una concentración de 50nM durante 30 horas tal y como se especifica en materiales y métodos. Transcurrido este tiempo las células fueron tratadas o no con taspargina (TG) a 50nM durante 15 y 24 horas. Los niveles de expresión de las proteínas ATF4, TRAIL-R2 y Noxa se detectaron mediante western-blot tal y como se especifica en materiales y métodos. Los niveles de GAPDH se emplearon como control de carga. Los datos mostrados son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

En conjunto, estos resultados indican que en respuesta a taspargina, se produce en células tumorales triple negativas un incremento mediado por ATF4 de los niveles de TRAIL-R2/DR5, que provocarían una mayor activación de caspasa 8 y de la ruta apoptótica extrínseca, en comparación con lo que se observa en la línea T47D de células tumorales luminales.

Nuestros datos sugieren que esta mayor activación de la ruta extrínseca en respuesta a tapsigargina junto con los elevados niveles basales de Noxa presentes en células triple negativas serían los responsables de la mayor sensibilidad de estas células a agentes inductores de estrés en el RE. Para comprobarlo, determinamos mediante experimentos de silenciamiento por RNA de interferencia, como la inhibición simultánea de caspasa 8 y la proteína BH3-only Noxa provoca una reducción en los niveles de apoptosis inducidos por tapsigargina que podemos reproducir cuando inhibimos conjuntamente la expresión de Noxa y TRAIL-R2/DR5 o Noxa y ATF4 (**Figura 56 A, B**).

A



B

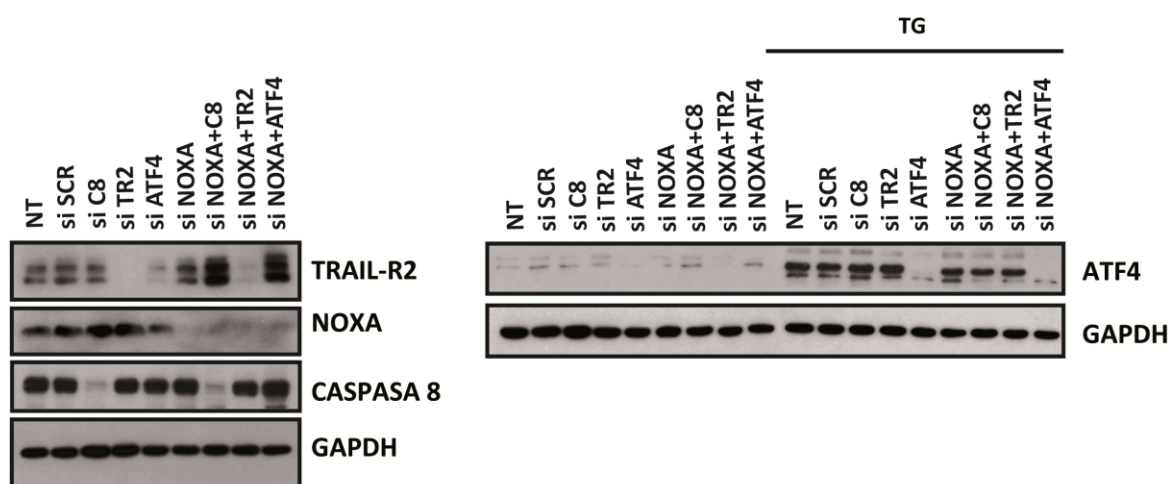


Figura 56: La ruta de ATF4 regula la activación de la ruta extrínseca (A) Células MDA-MB231 fueron transfectadas con el oligo de interferencia frente a TRAIL-R2, caspasas 8 (C8), Noxa y ATF4, el oligo scrambled (SCR) o no transfectadas (NT), a una concentración de 100nM durante 30 horas tal y como se especifica en materiales y métodos. Transcurrido este tiempo las células fueron tratadas o no con tapsigargina (TG) a 50nM durante 48 horas. La apoptosis se midió como el porcentaje de células en subG1 por citometría de flujo tal y como se describe en materiales y métodos. Los histogramas muestran los valores \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. **(B)** Células MDA-MB231 fueron transfectadas como en (A). Los niveles de expresión de las proteínas TRAIL-R2, caspasas 8 (C8), Noxa y ATF4, se detectaron mediante western-blot tal y como se especifica en materiales y métodos. Los niveles de GAPDH se emplearon como control de carga. Los datos mostrados son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

En resumen, podemos confirmar que la mayor sensibilidad a estímulos de estrés en el retículo observado en células tumorales de mama triple negativas en comparación con células tumorales luminales se debe por un lado a una mayor activación de la ruta de PERK/ATF4/CHOP que provoca el incremento en los niveles totales de TRAIL-R2/DR5 y en la superficie celular lo que conduciría a una mayor activación de caspasa 8 que, junto con la presencia de unos niveles basales mayores de proteínas BH3-only como Noxa, colaborarían en la inducción de apoptosis en estas células (**Figura 57**).

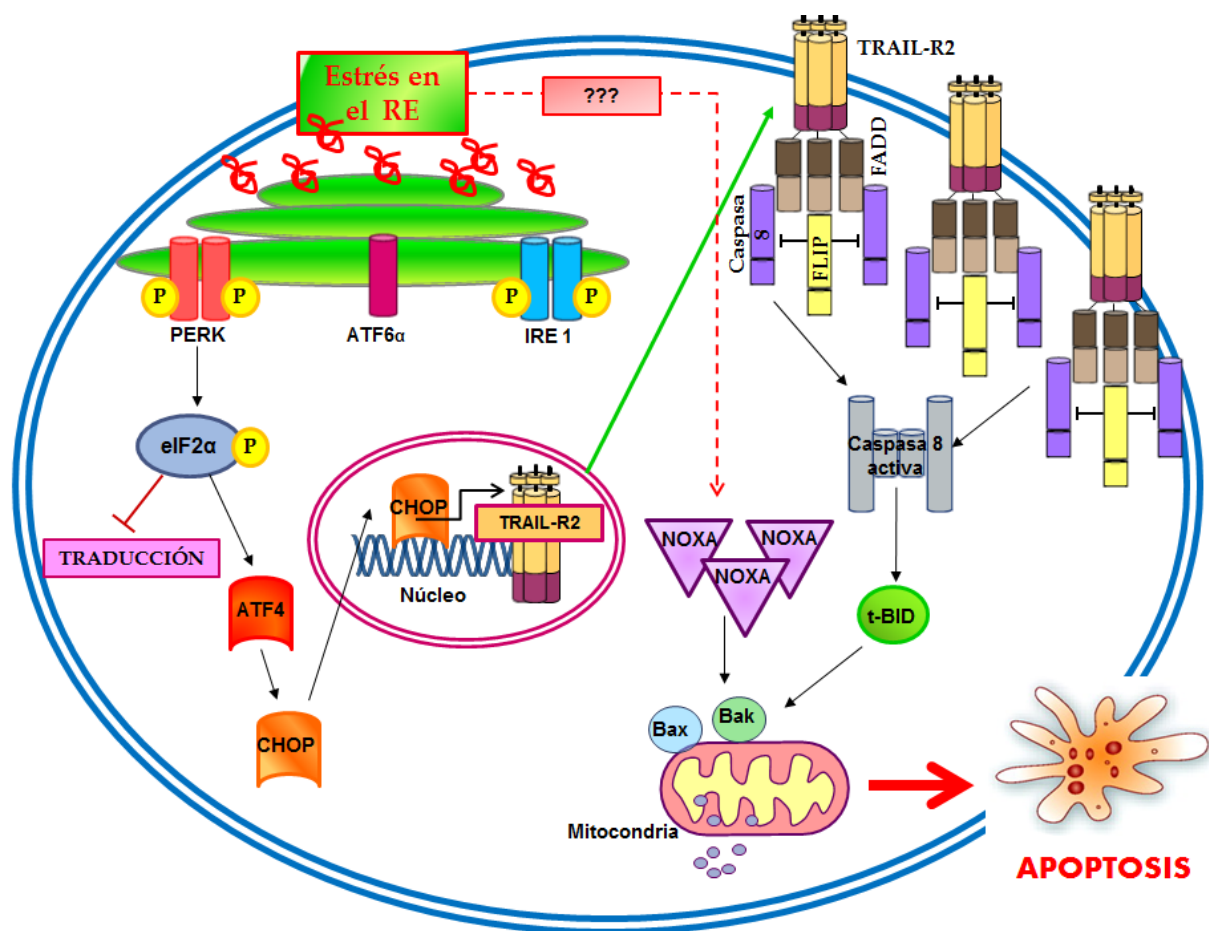


Figura 57: Mecanismo de sensibilización a estrés en el retículo endoplasmático en células tumorales de mama triple negativas. Un tratamiento prolongado con estímulos inductores de estrés en el RE provoca la acumulación de proteínas mal plegadas, que son detectadas por al menos tres proteínas sensoras presentes en el RE: Ire1, ATF6 y PERK. PERK fosforila a eIF2α que por un lado va a inhibir la síntesis global de proteínas y por otro induce la expresión de ATF4 que a su vez induce la transcripción de su principal gen diana CHOP. CHOP se une entonces al promotor del gen de TRAIL-R2/DR5 incrementando la expresión de este y promoviendo la activación de caspasa 8, que junto con la activación de la ruta mitocondrial mediada por los elevados niveles basales de Noxa, provocan la muerte celular por apoptosis.

4.5 cFLIP regula la muerte por estrés en el RE en células tumorales de mama.

Estudios previos describen en líneas tumorales humanas de diverso origen (pulmón, hígado y mieloma) y en líneas epiteliales humanas de mama transformadas con una forma constitutivamente activa del receptor de ERBB2/Her2 (MCF10A pNeuT) una regulación de la apoptosis inducida en respuesta a estímulos prolongados de estrés en el retículo endoplasmático, mediada exclusivamente por la ruta extrínseca (Lu et al. 2014; Martín-Pérez et al. 2014). Por ello nos preguntamos ¿Por qué las líneas tumorales de mama triple negativas no mueren exclusivamente por la ruta extrínseca tal y como se ha descrito previamente en otros modelos?

Con la intención de responder esta pregunta diseñamos una cinética en respuesta a taspigargina en células MDA-MB231 y células MCF10A pNeuT y analizamos la expresión de proteínas clave de la ruta extrínseca. De este modo observamos como el tratamiento con taspigargina promueve un incremento similar en los niveles de expresión de TRAIL-R2/DR5 en ambas líneas. Sin embargo y sorprendentemente, la reducción en los niveles de FLIP(L) que acompaña el aumento de TRAIL-R2/DR5 en las células MCF10A pNeuT no se observa en la línea tumoral de mama MDA-MB231 (**Figura 58A**). Dados estos resultados, decidimos analizar que ocurría con los niveles del cFLIP en respuesta a un tratamiento de estrés en el retículo endoplasmático en células BT549 y T47D, otros dos modelos de células humanas tumorales de mama y de nuevo comprobamos como los niveles de expresión de cFLIP permanecen invariables tras el tratamiento prolongado con taspigargina (**Figura 58B**).

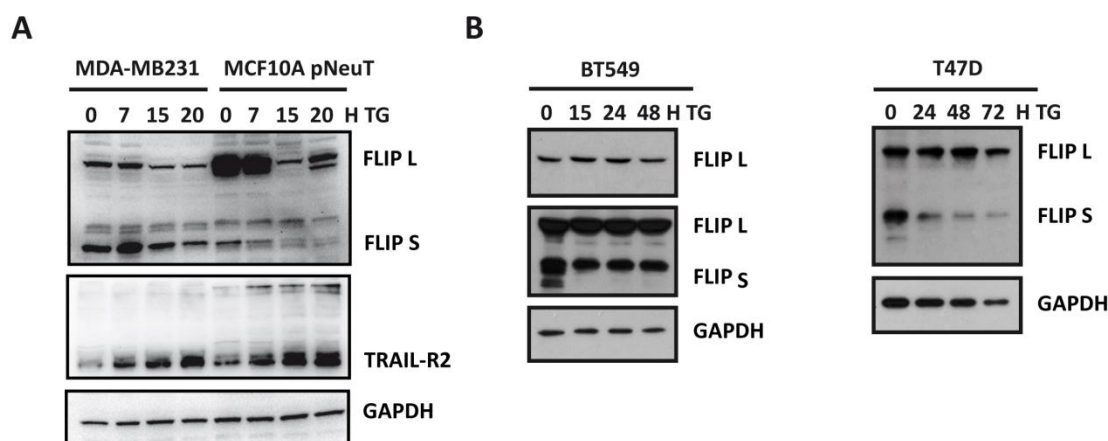
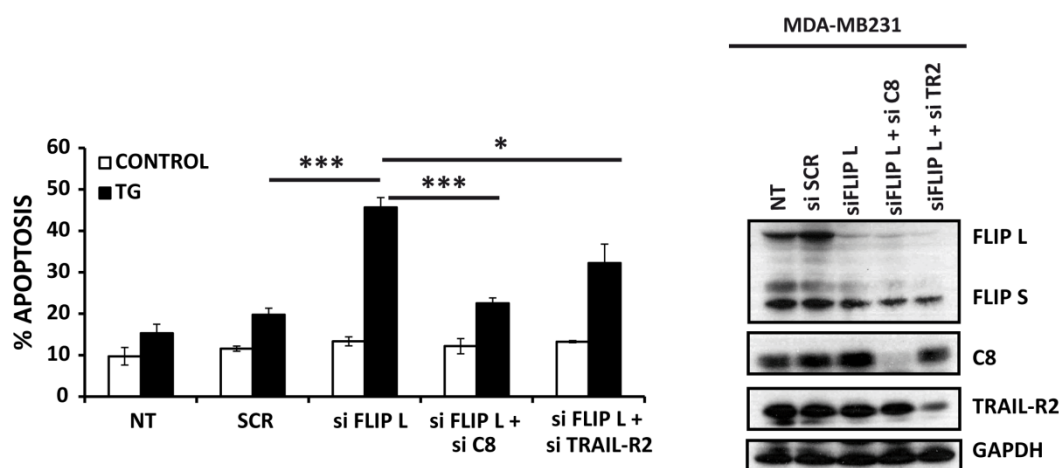


Figura 58: En células tumorales de mama el tratamiento con taspigargina no afecta a los niveles de FLIP (L). (A) Células MDA-MB231 y MCF10A pNeuT fueron tratadas con taspigargina (TG) a una dosis de 50nM durante 7,15 y 20 horas. Transcurrido ese tiempo los niveles de expresión de FLIP y TRAIL-R2/DR5 se determinaron mediante western-blot. Los niveles de GAPDH se emplearon como control de carga. (B) Células BT549 y T47D fueron tratadas con taspigargina (TG) a una dosis de 100nM durante 15,24 y 48 horas. Transcurrido ese tiempo los niveles de expresión de FLIP se determinaron mediante western-blot. Los niveles de GAPDH se emplearon como control de carga. Los datos mostrados son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

cFLIP es uno de los principales inhibidores de la apoptosis inducida por receptores de muerte. Por ello y con objeto de analizar si cFLIP podría estar jugando un papel en la regulación de la apoptosis inducida por estrés en el retículo endoplasmático, diseñamos experimentos de silenciamiento mediante RNA de interferencia frente a la proteína FLIP (L) y observamos como en ausencia de FLIP(L) la muerte inducida por taspigargina se acelera e incrementa en comparación con la células transfectadas con el oligo control (**Figura 59A**).

A



B

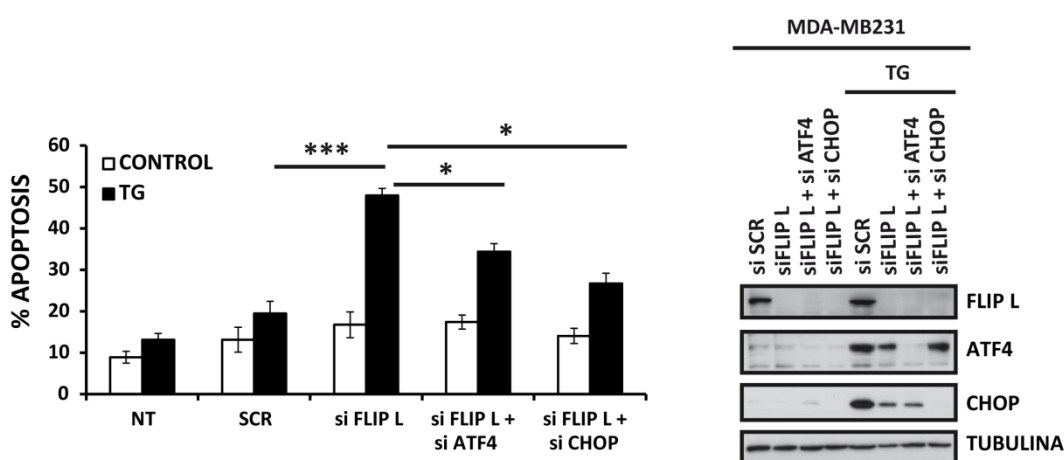


Figura 59: El silenciamiento de FLIP (L) acelera la apoptosis inducida por taspigargina en células MDA-MB231. (A) Células MDA-MB231 fueron transfectadas con el oligo de interferencia frente a FLIP (L) ,TRAIL-R2, caspasas 8 (C8), el oligo scrambled (SCR) o no transfectadas (NT), a una concentración de 100nM durante 30 horas tal y como se especifica en materiales y métodos. Transcurrido este tiempo las células fueron tratadas o no con taspigargina (TG) a 50nM durante 24 horas. La apoptosis se midió como el porcentaje de células en subG1 por citometría de flujo tal y como se describe en materiales y métodos. Los histogramas muestran los valores +/- SEM de al menos 3 experimentos independientes. Los niveles de expresión de las proteínas cFLIP, TRAIL-R2y caspasas 8 (C8), se detectaron mediante western-blot tal y como se especifica en materiales y métodos. Los niveles de GAPDH se emplearon como control de carga. Los datos mostrados son representativos de al menos 3 experimentos independientes. **(B)** Células MDA-MB231 fueron transfectadas con el oligo de interferencia frente a FLIP (L), ATF4, CHOP y el oligo scrambled (SCR) como en (A). Los niveles de expresión de las proteínas FLIP, ATF4 y CHOP se detectaron mediante western-blot tal y como se especifica en materiales y métodos. Los niveles de Tubulina se emplearon como control de carga. Los datos mostrados son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

Además, en ausencia de la proteína FLIP, la apoptosis inducida por taspigargina se reduce significativamente si se silencia de forma simultánea Caspasa 8 o TRAIL-R2/DR5 (**Figura 59A**). De igual manera, en ausencia de la proteína FLIP la apoptosis inducida por taspigargina se reduce si silenciarnos las proteínas de la UPR ATF4 y CHOP (**Figura 59B**).

Por último quisimos comprobar si este fenómeno era extensible a otros modelos de células humanas tumorales de mama. Con este fin, reproducimos los experimentos de silenciamiento mediante RNA de interferencia frente a las proteínas de la ruta extrínseca cFLIP, Caspasa 8 y TRAIL-R2/DR5 en células tumorales de mama T47D y MDA-MB468.

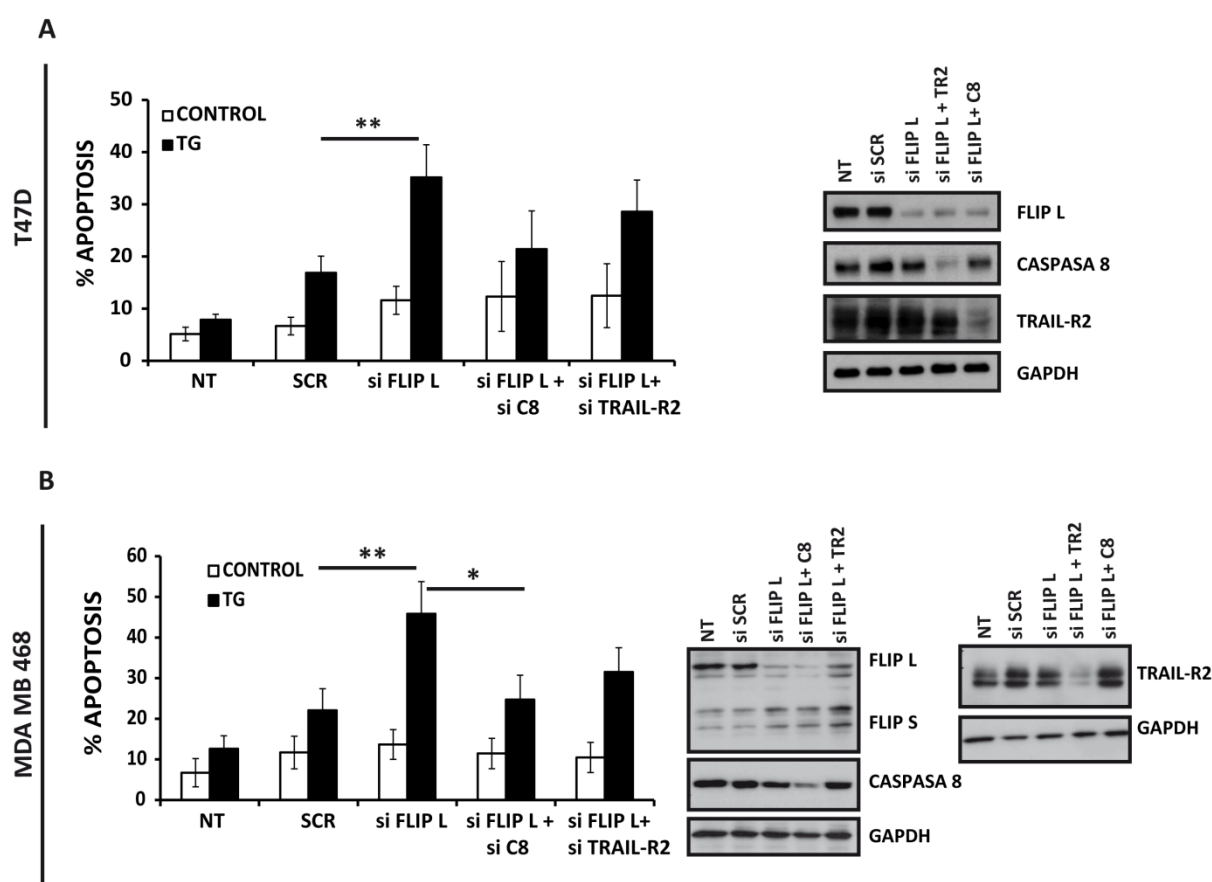


Figura 60: FLIP(L) regula la apoptosis inducida por taspigargina en células tumorales de mama (A) Células T47D fueron transfectadas con el oligo de interferencia frente a FLIP (L) ,TRAIL-R2, caspasas 8 (C8), el oligo scrambled (SCR) o no transfectadas (NT), a una concentración de 100nM durante 30 horas tal y como se especifica en materiales y métodos. Transcurrido este tiempo las células fueron tratadas o no con taspigargina (TG) a 100nM durante 24 horas. La apoptosis se midió como el porcentaje de células en subG1 por citometría de flujo tal y como se describe en materiales y métodos. Los histogramas muestran los valores \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. **(B)** Células MDA-MB468 fueron transfectadas como en (A). Los niveles de expresión de las proteínas cFLIP, TRAIL-R2 y caspasas 8 (C8), se detectaron mediante western-blot tal y como se especifica en materiales y métodos. Los niveles de GAPDH se emplearon como control de carga. Los datos mostrados son representativos de al menos 3 experimentos independientes

Tal y como se puede observar en la **figura 60** y de acuerdo con los resultados previos, la reducción en los niveles de FLIP previo al tratamiento con taspigargina incrementa la sensibilidad de ambos modelos celulares. Además este incremento en la apoptosis inducida por taspigargina se previene si silenciamos de manera simultánea a FLIP(L) alguna de las proteínas fundamentales de la ruta extrínseca Caspasa 8 o TRAIL-R2/DR5 (**Figura 60A, B**).

Estos resultados nos permiten afirmar que, en ausencia de FLIP, el mecanismo encargado de regular el proceso de muerte en respuesta a estímulos prolongados de estrés en el retículo endoplasmático, en líneas celulares humanas tumorales de mama, depende de las proteínas de la ruta extrínseca: caspasa 8 y TRAIL-R2/DR5, así como de las proteínas de la UPR: ATF4 y CHOP, coincidiendo con los datos descritos previamente por otros autores (Lu et al. 2014; Martín-Pérez et al. 2014).

En resumen, proponemos que el proceso implicado en la regulación de la apoptosis por estrés en el RE en células tumorales de mama, consta de 2 etapas. En un primer paso, tras un estímulo de estrés en el RE se induce la UPR y se activa un mecanismo de muerte dependiente de la ruta extrínseca que provoca un incremento en los niveles de expresión de TRAIL-R2/DR5, seguido de una mayor activación de caspasa 8 y la entrada en apoptosis. Sin embargo, si los niveles de FLIP permanecen suficientemente elevados como para inhibir la activación de caspasa 8, se impide la inducción de apoptosis, favoreciéndose la supervivencia celular y permitiéndose la adaptación a las nuevas condiciones de estrés. En un segundo paso y si el estrés perdura, los niveles de FLIP disminuyen, activándose la ruta extrínseca que, junto con la activación de la ruta intrínseca mitocondrial, promueven la inducción de la respuesta apoptótica de la UPR.

Discusión

CAPITULO I: Papel de las rutas de señalización MAPK/ERK y PI3K/AKT en la señalización de apoptosis por el ligando TRAIL.

La importancia de TRAIL como potencial agente terapéutico surge de su capacidad para ser selectivamente tóxico frente a células transformadas o tumorales pero no contra la mayoría de las células normales (Ashkenazi & Dixit 1998; Pitti et al. 1996; Wiley et al. 1995). Observaciones que fueron además confirmadas en estudios in vivo en los que TRAIL fue efectivo reduciendo el crecimiento del tumor sólido e induciendo la regresión tumoral en xenoinjertos (Walczak et al. 1999; Ashkenazi et al. 1999), sin la toxicidad sistémica observada con TNF α y FAS/CD95.

El mecanismo de esta sensibilidad diferencial fue inicialmente atribuido a la mayor expresión de los receptores “decoy” en células normales. Sin embargo, estudios posteriores no fueron capaces de correlacionar la expresión de estos receptores con la sensibilidad a TRAIL (Griffith et al. 1998; Zhang et al. 1999), surgiendo nuevas evidencias que sugerían que la resistencia a TRAIL podría encontrarse regulada intracelularmente (FLIP, XIAP, proteínas de la familia Bcl-2).

La unión de TRAIL a sus receptores pro-apoptóticos, además de activar apoptosis de manera dependiente de caspasas, puede también inducir, a través de estos receptores, rutas no-canónicas de supervivencia o proliferación en células tumorales resistentes, de manera similar a las señales inducidas por TRAIL en células normales (Azijli et al. 2013). De acuerdo con esto, nosotros observamos que tanto en la línea normal epitelial de mama MCF10A, como en la línea tumoral de cáncer de cérvix HeLa, la adición de TRAIL a estos cultivos celulares produce una rápida activación temprana de rutas de quinasas, que requiere de la presencia de caspasa-8. En este sentido, se ha descrito que TRAIL induce en primer lugar la formación del complejo de muerte DISC que señala para apoptosis y posteriormente la formación de un complejo secundario intracelular, que carece del ligando y el receptor pero conserva a FADD y caspasa-8 junto con RIP1, TRAF2 y NEMO, que es el responsable de la activación de rutas de quinasas (Varfolomeev et al. 2005).

Estudios previos con otros ligandos de la familia, también mostraron la importancia de la presencia de caspasa-8 no solo para la inducción de apoptosis, sino también para la activación de rutas de quinasas (Juo et al. 1998). Sin embargo, si la función de caspasa-8 es sólo como una proteína adaptadora o si se requiere su actividad enzimática para la señalización no apoptótica de TRAIL es un tema que todavía genera cierta controversia.

La exposición de células al inhibidor general de caspasas: z-VAD, estabiliza el complejo primario y retrasa la formación del complejo secundario, demorando así la activación de rutas de quinasas por TRAIL (Varfolomeev et al. 2005). Asimismo, el silenciamiento de FLIP(L), una molécula que inhibe el

reclutamiento y la activación de caspasa-8 en el DISC (Sharp et al. 2005), incrementa también la activación de quinasas por TRAIL (Varfolomeev et al. 2005), lo que sugiere la necesidad de la actividad caspasa-8 para la señalización no apoptótica de TRAIL. Además, dado que FADD también es necesario para la activación de estas rutas de quinasas (datos no mostrados) y forma parte del complejo secundario de TRAIL, la actividad enzimática de caspasa-8 también podría estar facilitando la disociación de FADD del receptor, aunque esto requiere de un estudio en mayor profundidad.

Nuestros resultados indican que entre los eventos tempranos inducidos por TRAIL se produce una activación de las rutas de MAPK/ERK y PI3K/AKT tanto en células normales como en tumorales y que la inhibición de la activación de estas rutas con inhibidores específicos, favorece la sensibilización de las células a TRAIL. Estos datos sugieren un papel anti-apoptótico de estas rutas y, de hecho, son varios los estudios que muestran como la estimulación por TRAIL de diversas rutas de quinasas podrían estar iniciando mecanismos de retroalimentación para retrasar el inicio del proceso apoptótico (Park et al. 2005; Falschlehner et al. 2007).

Por lo general, la activación de la ruta de MAPK/ERK por TRAIL, ha sido asociada con la estimulación de la supervivencia celular y la proliferación de las células tumorales. En este sentido se ha descrito que, el tratamiento con TRAIL induce la fosforilación de ERK1/2 en un panel de células humanas de melanoma con distintas sensibilidades a TRAIL y la inhibición de ERK1/2 provoca la reducción de los niveles de Bcl-2, Bcl-xl y Mcl-1, lo que explica el incremento de la apoptosis por la ruta mitocondrial inducida por TRAIL en estas células (Zhang et al. 2003). La proteína quinasa B (PKB) o AKT es una de las principales quinasas implicadas en la regulación de la supervivencia celular y elevados niveles de activación de esta ruta han sido asociados con la estimulación del crecimiento celular y la supervivencia de diversos tipos de cáncer (Vara et al. 2004).

La activación de AKT tras el tratamiento de células tumorales con TRAIL se ha descrito en líneas celulares de cáncer de mama, ovario y NSCLC (*del inglés, Non-Small Cell Lung Cancer*) resistentes a TRAIL y, en estas células, la inhibición de AKT inducía la sensibilización a la apoptosis (Xu et al. 2010; Azijli et al. 2012). De la misma manera, en células tumorales de colon, la inhibición de las rutas de MAPK/ERK y PI3K/AKT potenció la apoptosis inducida por TRAIL, mostrando que es el balance entre las rutas apoptóticas y de supervivencia lo que determina el destino de la célula en respuesta a TRAIL (Vaculová et al. 2006).

Por tanto, y de acuerdo con estos datos, nuestros resultados sugieren que la unión de TRAIL a sus receptores pro-apoptóticos, estaría activando simultáneamente una ruta canónica cuya finalidad es la inducción de apoptosis y un conjunto de rutas no canónicas cuya función sería la de inhibir o retrasar la entrada en apoptosis de la célula, actuando como mecanismo de control que regula que la

célula únicamente muera cuando se dan las condiciones estrictamente necesarias ya que, si el estímulo apoptótico permanece y la activación de caspasas es lo suficientemente fuerte, la apoptosis prevalecería. Sin embargo, aún no se conocen con claridad los mecanismos moleculares que vinculan los eventos relacionados con la señalización de apoptosis y la activación de estas quinasas. En este sentido, nuestros datos muestran como en células normales, la inhibición de la activación de las rutas de MAPK/ERK y PI3K/AKT por TRAIL favorece la formación del complejo inductor de muerte (DISC), apreciándose un mayor reclutamiento de las proteínas TRAIL-R2, FADD y pro-caspasa 8, aunque los cambios más significativos se producían en los niveles de FADD que aumentaban considerablemente en comparación con los niveles detectados en células no tratadas con los inhibidores de ambas rutas. Este incremento en los niveles de proteína adaptadora, permitiría un mayor reclutamiento de caspasa-8 en el DISC y por consiguiente una mayor activación e inducción de la apoptosis. Datos previos en la literatura apoyan nuestros hallazgos, al sugerir la posibilidad de que las rutas de supervivencia puedan directamente influir sobre los eventos más tempranos de la formación del DISC. Este es el caso de la proteína quinasa C (PKC), cuya activación inhibe el procesamiento de la caspasa-8 y la sensibilidad de las células a TRAIL debido a una reducción en el reclutamiento de FADD en el DISC (Meng et al. 2002; Harper et al. 2003), lo que proporciona un papel fundamental para PKC en la modulación de los componentes del DISC.

Además se ha descrito, que la activación de PKC inhibe la apoptosis inducida por TRAIL a nivel de la mitocondria, impidiendo la translocación de Bax, de manera dependiente de la ruta de MAPK (Sarker et al. 2002; Zhang et al. 2003). Asimismo, se ha observado como la activación de la ruta de MAPK podrían estar inhibiendo la activación de apoptosis al impedir la translocación de Bid truncado a la mitocondria sin afectar a su procesamiento (Ortiz-Ferrón et al. 2006). De esta manera, se plantean dos posibles puntos de regulación de la apoptosis inducida por TRAIL controlados por la activación de rutas de quinasas: uno a nivel apical durante la formación del DISC y un segundo a nivel de la mitocondria, lo que garantiza que el proceso de muerte tan solo se produzca cuando la intensidad del estímulo apoptótico o su duración permitan el escape de este mecanismo de control.

Debido a que ambas rutas (apoptótica y no apoptótica), se activan de manera simultánea, el efecto que estas rutas de quinasas ejercen sobre los componentes de la señalización apoptótica debe ser inmediato, lo que nos sugiere la posibilidad de que se estén promoviendo determinadas modificaciones post-traduccionales sobre los principales componentes encargados de iniciar toda la maquinaria de muerte celular. En este sentido, se ha sugerido que las rutas de PI3K/AKT y MAPK/ERK pueden suprimir la actividad de caspasa-9, -8 y -3 a través de fosforilaciones directas en serina/treonina en estos sustratos apoptóticos (Alvarado-Kristensson et al. 2004; Allan et al. 2003), aunque el papel de estas modificaciones en la actividad caspasa sigue siendo aún objeto de estudio.

En células de adenocarcinoma de próstata: DU-145, se ha descrito que la activación de AKT por TRAIL se encuentra mediada por la tirosina quinasa Src y la inhibición tanto de AKT como de Src potencia la apoptosis inducida por TRAIL (Song et al. 2010). En línea con esto, se ha observado que la quinasa Src puede fosforilar a la caspasa-8 en la Tirosina-380 impidiendo la apoptosis inducida por activación del receptor de muerte CD95/Fas (Cursi et al. 2006), debido a que la fosforilación de la procaspasa-8 en este residuo impide su completa activación en el DISC (Powley et al. 2016). Del mismo modo, cabe la posibilidad de que estas rutas estén alterando el estado de fosforilación de la proteína adaptadora FADD, aunque no parece que esto afecte a la afinidad de FADD por el DISC (Harper et al. 2003; Scaffidi et al. 2000). En cambio, se ha descrito que la fosforilación de FADD en la Serina 194 es esencial para el crecimiento y la proliferación celular (Scaffidi et al. 2000; Hua et al. 2003; Alappat et al. 2003), por lo que podría estar implicado en otras funciones no apoptóticas dirigidas por estas quinasas.

Por último, la activación de las rutas de MAPK/ERK y PI3K/AKT, podría estar afectando al estado de fosforilación de los receptores pro-apoptóticos de TRAIL y con ello al punto de partida de la señalización de apoptosis por TRAIL. Se ha identificado la internalización de los receptores de TRAIL como un mecanismo de resistencia de ciertas células tumorales a la apoptosis (Kohlhaas et al. 2007; Zhang & Zhang 2008). Nuestros datos muestran, en cambio, que estas rutas no afectan al proceso de internalización del receptor pro-apoptótico TRAIL-R2. Sin embargo, aunque TRAIL-R2 es el principal receptor pro-apoptótico en células MCF10A, no podemos descartar la posible participación de TRAIL-R1 en todo este proceso.

En resumen, podemos concluir que las rutas de MAPK/ERK y PI3K/AKT además de su papel en la regulación del ciclo celular, el metabolismo y la diferenciación celular, también pueden actuar modulando la apoptosis inducida por los receptores de muerte de TRAIL, aunque conocer el mecanismo implicado y la regulación del complejo inductor de muerte en estas células en respuesta a TRAIL, requiere de un estudio en mayor profundidad. Proponemos por tanto que en respuesta a TRAIL se establece un balance y una relación cruzada entre la señalización apoptótica y no apoptótica, de forma que en un primer momento la activación por TRAIL de rutas de quinasas estaría inhibiendo la formación del DISC, retrasando la activación de caspasa-8, proporcionando de esta manera cierto periodo de tiempo que permita a la célula adaptarse a las nuevas condiciones. Esta regulación de la apoptosis inducida por TRAIL está presente tanto en líneas tumorales como en líneas normales lo que sugiere que los mecanismos pro-tumorigénicos presentes en las líneas tumorales, forman parte de la señalización fisiológica normal de las células no transformadas que la emplean como mecanismos de protección frente a los niveles basales de TRAIL circulante o expresado en células efectoras del sistema inmune, impidiendo que la célula entre en apoptosis.

El uso de tratamientos combinados de TRAIL con inhibidores de rutas de señalización antiapoptóticas como las rutas MAPK/ERK y PI3K/Akt se ha propuesto como posible terapia frente a células tumorales resistentes a TRAIL. Sin embargo, los resultados anteriores demuestran que la aplicación simultánea de TRAIL y los inhibidores de estas rutas activan de manera clara la señalización apoptótica de TRAIL en células tumorales y no tumorales, lo que desaconsejaría el uso de estos tratamientos en clínica. Resultados de nuestro laboratorio previos a esta tesis indicaban que en células humanas no tumorales de mama dependientes de EGF para su crecimiento, la inhibición prolongada de la actividad tirosina quinasa del receptor EGFR por privación de EGF en el medio de cultivo o por tratamiento con Gefitinib, hacía a estas células completamente resistentes a la acción proapoptótica de TRAIL (Yerbes et al. 2012). Una consecuencia importante de la inhibición del EGFR es la inhibición de rutas de señalización que emanan del mismo como son PI3K/Akt y MAPK/ERK (Yerbes et al. 2012). Es decir, a diferencia de la sensibilización a TRAIL que ocurre en tratamientos simultáneos con TRAIL e inhibidores de estas rutas, la inhibición sostenida de las mismas, da lugar a una resistencia marcada a TRAIL en células no tumorales. La pregunta que nos hicimos en esta tesis es si existía el mismo comportamiento frente a una inhibición previa y prolongada de estas rutas de señalización en la sensibilidad a TRAIL de diversas células tumorales. Nuestros resultados muestran que la inhibición prolongada de las rutas de MAPK/ERK y PI3K/AKT ejerce efectos opuestos en líneas normales y tumorales en cuanto a su sensibilidad a TRAIL.

En líneas no-transformadas, la ruta de MAPK/ERK está controlando negativamente los niveles de FLIP lo que concuerda con resultados previos de nuestro grupo en el que se demuestra como la retirada prolongada de EGF o la inhibición de la señalización del EGFR, induce resistencia a TRAIL en células no tumorales epiteliales de mama, a través del incremento en los niveles de cFLIP(L) y la inhibición temprana de la activación de la caspasa-8 (Yerbes et al. 2012). Además, en células MCF10A se ha demostrado como la ausencia de FLIP(L) induce apoptosis mediada por TRAIL endógeno y reduce el número de acinos en cultivos tridimensionales (Yerbes et al. 2011) lo que sugiere el papel de FLIP en la supervivencia de las células. También hemos observado que tanto la retirada de EGF como la inhibición específica de la ruta de ERK induce parada en G1/S (datos no mostrados) que correlaciona directamente con la sensibilidad de estas células a TRAIL. En células T periféricas, se ha demostrado con agentes bloqueantes del ciclo, que las células paradas en G1 contiene niveles elevados de la proteína FLIP, mientras que células paradas en fase S presentan niveles bajos de FLIP (Algeciras-Schimnich et al. 1999), por lo que no podemos descartar un posible mecanismo de resistencia a apoptosis relacionado con una parada en el ciclo celular que pudiera de algún modo también afectar a los niveles de FLIP.

Por su parte, en líneas tumorales de diverso origen, hemos observado que en contraste con lo que ocurría en líneas normales, la ruta de ERK no afecta a los niveles de FLIP. De hecho, nuestro grupo ha demostrado como en líneas normales, la ruta de ERK mantiene elevados los niveles de c-myc, que van regular negativamente los FLIP (Yerbes et al. 2012), lo que concuerda con datos previos que muestran como c-myc puede unirse y reprimir el promotor de cFLIP, sensibilizando las células a la apoptosis inducida por TRAIL (Ricci et al. 2004). Por otro lado, en líneas tumorales esta ruta se encuentra frecuentemente disociada de la regulación de los niveles de FLIP que podría encontrarse regulada por otra ruta de supervivencia (Gibson 2004). Sin embargo, nuestros resultados indican que el silenciamiento de c-myc mediante RNA de interferencia, no afecta a los niveles de FLIP, lo que sugiere además la existencia de un mecanismo completamente diferente de regulación de los niveles de FLIP en líneas tumorales. Además observamos cómo, tan solo en líneas tumorales, la inhibición de la ruta de PI3K/AKT reducía los niveles proteína de FLIP(L) aunque no los de RNA mensajero. cFLIP es una proteína de vida media corta, que se sintetiza y degrada constantemente por el proteasoma (Poukkula et al. 2005) lo que plantea una posible regulación a nivel de proteína mediada por la ruta de PI3K/AKT que requiere de un estudio en mayor profundidad.

Finalmente nos preguntamos, ¿Qué ocurriría si trasladamos estos datos a un contexto más cercano a lo fisiológico? El crecimiento de células de mama en cultivos en 3D, permiten la reorganización celular en estructuras similares al epitelio glandular, proporcionando un modelo de estudio del comportamiento celular en un contexto biológico más relevante. En estas condiciones de cultivo en 3D, las células normales epiteliales proliferan y se organizan formando estructuras esféricas denominadas acinos, caracterizados por tener un lumen central, rodeado de una capa de células polarizadas, una membrana basal y poseer un preciso control del crecimiento y la proliferación celular. Por su parte, las células tumorales de mama no van a formar acinos sino que desarrollan estructuras de células no polarizadas (Debnath et al. 2003; Debnath & Brugge 2005).

Datos publicados por el grupo de Mina Bissell muestran que los acinos formados a partir de células normales no activan la ruta de MAPKs tras una estimulación con EGF, mientras que las estructuras irregulares correspondientes al cultivo de células tumorales en 3D, mantiene la habilidad de responder a EGF activando la ruta de MAPK (Wang et al. 1998; Weaver et al. 2002). De este modo y según nuestra hipótesis en un tejido *in vivo*, las células normales organizadas en acinos presentarían elevados niveles de FLIP(L) debido a la ausencia de señalización de la ruta de ERK, lo que provocaría la resistencia de éstas células a la apoptosis inducida por TRAIL, mientras que las células tumorales estas rutas se encuentran generalmente desreguladas, manteniendo los niveles de FLIP bajos, lo que favorecería una mayor sensibilidad de estas células a TRAIL.

Todo esto plantea nuevos puntos de estudio que relacionen la polaridad y la proliferación celular con los niveles de FLIP y la sensibilidad de las células a la apoptosis por activación de receptores proapoptóticos de TRAIL.

CAPITULO II: Regulación por el oncogén ErbB2/Her2 de la activación de apoptosis por TRAIL en células epiteliales de mama humanas.

Para estudiar los mecanismos que regulan la sensibilidad diferencial a TRAIL de células normales y tumorales, empleamos un modelo previamente descrito de transformación oncogénica in vitro, basado en células humanas epiteliales de mama MCF10A que han sido modificadas para sobreexpresar el receptor tirosina quinasa (RTK) ErbB2 de rata (Haenssen et al. 2010): Células MCF10A retroviralmente transformadas con una forma wt de ErbB2 (NeuN) o con una forma mutante constitutivamente activa del ErbB2 (NeuT).

Etapas tempranas del cáncer de mama se caracterizan por un incremento en la proliferación de células epiteliales y una pérdida de la organización acinar denominada DCIS (*del inglés, Hyperplasia and Ductal Carcinoma In Situ*). ErbB2 se encuentra amplificado y sobreexpresado en un 20-80% de los casos de DCIS y la sobreexpresión de ErbB2 correlaciona con un mal pronóstico de nódulos tumorales positivos (Muthuswamy et al. 2001). Por esta razón elegimos este modelo de transformación oncogénica in vitro que nos va a permitir conocer la contribución específica de ErbB2 a la transformación del epitelio mamario y la sensibilidad a la apoptosis inducida por TRAIL.

Las células no transformadas de mama MCF10A requieren EGF para proliferar (Soule et al. 1990). En cultivos en dos dimensiones adoptan una morfología epitelial, mientras que si se cultivan en tres dimensiones, creciendo sobre matrigel, desarrollan estructuras acinares compuestas por células epiteliales polarizadas que dejan de crecer (Petersen et al. 1992) y que mimetizan a los acinos presentes en la mama adulta. El epitelio mamario adulto se encuentra organizado en conductos y lóbulos. Los conductos terminan en estructuras altamente ramificadas conocidos como TDLU (*del inglés, Terminal Ductal Lobular Unit*) cuya unidad individual se denomina acino (Muthuswamy et al. 2001). Nuestros resultados muestran como, de acuerdo con datos recientemente descritos, las células MCF10A transformadas con la forma wt de ErbB2 (NeuN) adoptan en dos dimensiones, una morfología epitelial muy similar a su homólogo parental MCF10A, mientras que las células que sobreexpresan la forma mutada y constitutivamente activa de ErbB2 (NeuT) se caracterizan por su morfología tipo fibroblástica, que sugiere que han podido experimentar una transición epitelio-mesénquima (Tchafa et al. 2015), la cual queda confirmada por la expresión de marcadores mesenquimales y factores de transcripción de EMT (EMT-TFs).

En cuanto al cultivo de estas células en tres dimensiones, observamos como las células MCF10A pNeuN crecen formando estructuras de acinos anormales agregados (que denominaremos como estructuras multiacinares), con un retraso en la formación del lumen. Por su parte, las células

MCF10A pNeuT, desarrollan un fenotipo más agresivo con un comportamiento similar al carcinoma ductal invasivo (IDC, *del inglés, Invasive Ductal Carcinoma*) con protusiones invasivas, propio del crecimiento de células malignas, caracterizado por la pérdida de polaridad apico-basal, la desorganización celular y la formación de túbulos que se ramifican y se infiltran caprichosamente en el estroma de alrededor (Pal & Kleer 2014). Resultados similares se obtuvieron en células MCF10A que expresan de manera estable una quimera inducible del receptor ErbB2 de rata denominada: p75.B2, cuya homodimerización se promueve por la unión del ligando sintético AP1510 (Muthuswamy et al. 1999). La activación del ErbB2 en los acinos ya formados inducía una proliferación descontrolada, una alteración de la organización epitelial normal y protección frente a la apoptosis que permitía la supervivencia celular en el interior del lumen del acino, lo que provocaba la formación de estructuras multiacinares (Muthuswamy et al. 2001). Además estos cambios se correspondían con los observados en las lesiones hiperplásicas inducidas por la expresión de ErbB2 en la glándula mamaria de ratones transgénicos (Andrechek et al. 2000).

Sin embargo, existen algunas diferencias entre ambos modelos. Por un lado, a pesar de que la activación de este ErbB2 quimérico induce la pérdida de las uniones estrechas y de la polaridad apical en cultivos convencionales, no se produce una transformación fenotípica completa, como en el caso de las NeuT (Haenssen et al. 2010), ya que las células MCF10A p75.B2 mantienen sus propiedades epiteliales y son incapaces de invadir la membrana basal o desarrollar un crecimiento independiente de anclaje (Muthuswamy et al. 2001). Además, la activación de p75.B2 no es suficiente para inducir un comportamiento invasivo en matrigel, que si podemos observar en las células MCF10A pNeuT, sino que el comportamiento se asemeja más al que nosotros observamos en células MCF10A pNeuN que sobreexpresan la forma wt de ErbB2. En conjunto, podemos afirmar que la homodimerización de ErbB2 fuerza al acino a reiniciar su proliferación y perder su organización tridimensional, induciendo un fenotipo característico de una etapa temprana o premaligna del cáncer de mama que indica una transformación celular inducida por el oncogen y la expresión constitutivamente activa de ErbB2 provoca cambios en la organización de células no tumorales epiteliales de mama en cultivos bi- y tridimensionales equivalentes a los observados en etapas tumorales malignas.

Los tumores sólidos consisten en una mezcla de poblaciones heterogéneas de células dentro de las cuales una pequeña población denominada células madre cancerígenas (CSCs, *del inglés, Cancer Stem Cells*) es la responsable del crecimiento y mantenimiento del tumor (Al-Hajj & Clarke 2004). En este sentido, se ha demostrado la existencia de poblaciones celulares tumorales tumorogénicas o no tumorogénicas, aisladas de tumores de mama humanos, caracterizándose el conjunto de células con capacidad para formar nuevos tumores como CD24^{-/low}/CD44⁺ (Al-Hajj et al. 2003).

Nosotros observamos como la activación constitutiva de ErbB2 en células MCF10A epiteliales de mama, favorece la adquisición de características de célula madre tales como el crecimiento en mamíferas y un enriquecimiento en células progenitoras o células madre de mama CD24^{-low}/CD44⁺. Numerosas evidencias indican que ErbB2 es un importante regulador de la población de CSCs en tumores de mama (Paik et al. 2008; Ithimakin et al. 2013), de manera que la sobreexpresión de ErbB2 incrementa y el bloqueo de ErbB2 reduce la población de CSC en líneas tumorales de mama y en xenoinjertos en ratón (Korkaya et al. 2008). En este sentido, también se ha demostrado como la activación de la ruta de señalización de RAS/MAPK en células no tumorogénicas epiteliales de mama: HMEC y MCF10A, favorece la adquisición de propiedades de células progenitoras mediado por la inducción de EMT (Morel et al. 2008; Morel et al. 2012).

A pesar del éxito de la terapia hormonal para los tumores ER+ (*del inglés, estrogen receptor*) y los agentes anti Her2, muchas mujeres con cáncer de mama que reciben estas terapias sufren recaídas y además prácticamente todos aquellos casos con tumores de mama en estados avanzados desarrollan resistencia a estas terapias dirigidas y a la quimioterapia, por lo que el tumor de mama metastásico resulta incurable (Korkaya & Wicha 2013). Nosotros observamos cómo tanto en cultivos convencionales como tridimensionales las células MCF10A pNeuT son significativamente más sensibles que las células MCF10A y las células MCF10A pNeuN, a la apoptosis inducida por TRAIL.

Nuestros resultados indican que la mayor sensibilidad a TRAIL de las células que expresan la forma constitutivamente activa de ErbB2 no se debe a la adquisición de un fenotipo mesenquimal ni a la inducción de un proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT), ya que ni el silenciamiento del factor de transcripción Snail, ni el estudio de la sensibilidad a TRAIL en otro modelo de transición epitelio-mesénquima en células epiteliales de mama HMEC, sugirieron la existencia de un vínculo entre la EMT y la señalización apoptótica de TRAIL. En la literatura podemos encontrar diversos trabajos que sugieren la existencia de una posible relación entre los procesos asociados con el desarrollo de la EMT y el sistema TRAIL. Por una parte se ha descrito que células tumorales de mama triple negativas con fenotipo mesenquimal son más sensibles a la apoptosis inducida por TRAIL que las que presentaban un fenotipo epitelial (Rahman et al. 2009). Además, la deficiencia en el receptor pro-apoptótico de TRAIL en un modelo de carcinoma celular escamoso en ratón, promueve la formación de metástasis en nódulos linfáticos sin afectar al desarrollo del tumor primario, lo que sugiere un posible papel para el sistema TRAIL como supresor selectivo de metástasis (Grosse-Wilde et al. 2008). En contraposición, recientemente se ha descrito en células tumorales que la EMT específicamente reduce la señalización apoptótica a través de los receptores pro-apoptóticos TRAIL-R1 y TRAIL-R2 debido a la ausencia de la proteína de adhesión celular E-caderina, por lo que el

“clustering” de los receptores se encontraría inhibido y con ellos se produciría un menor ensamblaje del complejo inductor de muerte DISC y una menor activación de caspasa-8 (Lu et al. 2014).

Por otra parte, la activación constitutiva de ErbB2 provoca una desregulación de las rutas de señalización intracelulares que controlan el metabolismo celular, el crecimiento y la proliferación (Citri & Yarden 2006). De esta manera, una de las principales consecuencias de la sobreexpresión de este receptor es la estimulación constitutiva de las rutas de quinasas MAPK/ERK y PI3K/AKT con la consiguiente activación de la serina/treonina quinasa mTOR, un regulador fundamental de la síntesis de macromoléculas, la autofagia, la proliferación celular y el metabolismo celular (Polak & Hall 2009). De acuerdo con datos previos publicados, en las células que sobreexpresan la forma mutada y constitutivamente activa de ErbB2 (NeuT) la ruta de ERK1/2 no se inhibe por retirada de EGF y al contrario de lo que ocurre en células MCF10A y MCF10A pNeuN, la privación de EGF no reduce la sensibilidad de las células a TRAIL, sugiriendo que la activación constitutiva de la ruta de ERK1/2 y la expresión de c-myc en estas células es responsable del mantenimiento de los niveles de FLIP(L) bajos y la sensibilidad a TRAIL es independiente del aporte de EGF (Yerbes et al. 2012).

Sin embargo, el análisis de la inhibición específica de las rutas MAPK/ERK, PI3K/AKT en el modelo de transformación tumoral MCF10A pBabe/pNeuN/pNeuT reveló que de acuerdo con los resultados descritos en el capítulo anterior en diferentes líneas epiteliales de mama no tumorales, la inhibición de las rutas de MAPK/ERK y PI3K/AKT, así como la inhibición de la actividad tirosín quinasa de ErbB2, protege a las células de la apoptosis inducida por TRAIL mediante el incremento en la expresión de la proteína anti-apoptótica FLIP(L). Por su parte, la inhibición específica de mTOR también bloqueó significativamente la sensibilidad de las células MCF10A a TRAIL, aunque no se observaron cambios en los niveles de FLIP(L), lo que sugiere la existencia de un mecanismo alternativo de regulación de la sensibilidad a TRAIL en este modelo celular.

La diana de Rapamicina en células de mamíferos: mTOR, es un regulador de la autofagia (Sarkar 2013) y la traducción de proteínas dependiente de cap (Polak & Hall 2009), por lo que su inhibición, podría afectar directamente a los niveles de receptores pro-apoptóticos favoreciendo su degradación mediante un mecanismo dependiente de autofagia o afectando a la traducción de proteínas. En este sentido, datos previos del grupo mostraban como la transformación oncogénica por Ras, bloqueaba la autofagia inducida por TRAIL y favorecía la sensibilidad de estas células al ligando de muerte (datos no publicados). Además, se ha asociado la tumorigénesis mamaria con defectos en la respuesta autofágica (Gozuacik & Kimchi 2004) y se ha descrito que los tumores de mama ErbB2 positivos son deficientes en la inducción de autofagia (Lozy et al. 2014). No obstante, el papel de mTOR en la regulación de la sensibilidad de las células a TRAIL requiere de un estudio en mayor profundidad.

Por último, el análisis de la sensibilidad a TRAIL del modelo de transformación tumoral MCF10A mock/wtHER2/p95HER2 nos muestra un patrón de respuesta a TRAIL en cultivos convencionales similar al que obtenemos en células MCF10A pBabe/pNeuN/pNeuT. En cuanto a la sensibilidad de estas células a TRAIL en cultivos tridimensionales, disponemos de datos preliminares que confirman lo observado en dos dimensiones, una sensibilidad a TRAIL más pronunciada en células wtHER2 que en células mock. Además, las células p95HER2 son las más sensibles, sin embargo y aunque de forma menos agresiva que las células pNeuT, las células p95 también presentan un crecimiento multiacinar que impide la cuantificación objetiva de la muerte (datos no mostrados).

Finalmente y en relación al estado mesenquimal que presentan las células MCF10-A pNeuT, señalar que todas las células del modelo MCF10-A mock/wtHER2/p95HER2 presentan una morfología adoquinada típica epitelial y que el análisis preliminar de marcadores clásicos de transición epitelio mesénquima (E-Caderina, Ocludina, Snail y Zeb1) no muestra diferencia alguna (datos no mostrados). Lo que de nuevo nos permite disociar la mayor sensibilidad de las células que sobreexpresan el oncogén ErbB2 del estado mesenquimal de las mismas.

En resumen, nuestros resultados indican que en líneas no tumorales epiteliales de mama existe una relación entre la activación del receptor de ERBB2 y la sensibilidad a TRAIL, de manera independiente de la transición epitelio-mesénquima, aunque son necesarios más experimentos para tratar de demostrar por qué la sobreactivación de estas rutas comúnmente asociadas con supervivencia celular, favorecen la apoptosis inducida por TRAIL.

CAPITULO III: Estudio de la función reguladora del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento transformante (TGF- β) en la señalización de apoptosis por TRAIL.

Durante los últimos años se han desarrollado numerosos estudios preclínicos dirigidos a demostrar cómo TRAIL y anticuerpos agonistas frente a los receptores pro-apoptóticos TRAIL-R1 y TRAIL-R2 inducen apoptosis en células tumorales sin afectar a la mayoría de las células normales (Ashkenazi & Dixit 1999; Walczak et al. 1999). Sin embargo, en estos prometedores ensayos clínicos no se han obtenido los resultados esperados debido entre otros factores, a la existencia de resistencia a TRAIL en muchos tumores primarios (Grosse-Wilde et al. 2008) por lo que, en la actualidad, se están desarrollando nuevas formulaciones que permitan incrementar la eficacia de las terapias basadas en APO2L/TRAIL (De Miguel et al. 2016) . Por otro lado, a pesar de todas las evidencias existentes sobre la regulación de la sensibilidad a TRAIL en células tumorales (Lemke et al. 2014), son muchas las incógnitas sin resolver relacionadas con cómo las células normales responden a la acción del ligando de muerte.

Comprender las diferencias en la regulación y mecanismos implicados en la respuesta de células tumorales y normales a TRAIL, permitiría el desarrollo de terapias antitumorales más eficientes y dirigidas. En este sentido, nuestro grupo recientemente ha demostrado que la activación del receptor de EGF (EGFR) reduce la expresión de cFLIP potenciando la sensibilidad de células humanas epiteliales de mama no transformadas a la apoptosis inducida por TRAIL (Yerbes et al. 2012). Además, la sensibilidad de células epiteliales de mama dependiente de EGF, a diferentes estímulos apoptóticos, entre los que se incluye TRAIL, es eliminada en cultivos tridimensionales (3D) (Weaver et al. 2002). Por otro lado, también se ha descrito que los niveles de TRAIL incrementan durante el proceso de morfogénesis de células epiteliales de mama favoreciendo la inducción de un proceso de autofagia, que junto con elevados niveles de Bim permite la formación del lumen del acino (Reginato et al. 2005; Mills et al. 2004). En este sentido, en células MCF10A, la sobreexpresión del inhibidor de caspasa-8: FLIP(L), retrasa la formación del lumen en cultivos tridimensionales (Yerbes et al. 2011), lo que sugiere que la ruta extrínseca de apoptosis tiene un papel en la formación de los acinos durante el proceso de morfogénesis normal de la mama.

El factor β de crecimiento transformante (*TGF β , del inglés Transforming growth factor- β*) ejerce múltiples funciones en células epiteliales de mama. TGF β , es un potente inhibidor del crecimiento en etapas tempranas del cáncer de mama, pero también puede contribuir a la progresión del tumor, promoviendo la invasión y la metástasis en etapas más avanzadas (Moses & Barcellos-hoff 2011).

En este capítulo, nosotros hemos analizado la relación entre EGF y TGF- β en la regulación de la apoptosis inducida por TRAIL en células no tumorales epiteliales de mama dependientes de EGF observando cómo, el tratamiento con TGF- β reduce significativamente la activación de caspasa-8 en el DISC y en consecuencia la apoptosis inducida por TRAIL. Sorprendentemente, la menor sensibilidad de estas células a TRAIL no se encontraba asociada a una reducción a nivel de proteína de los principales componentes del DISC, lo que nos sugería la existencia de un mecanismo alternativo implicado en la inhibición por TGF- β de la señalización temprana de TRAIL.

El análisis de los niveles en membrana del principal receptor pro-apoptótico de estas células: TRAIL-R2, nos mostró que el tratamiento con TGF- β promovía una reducción en su expresión en la superficie celular que correlacionaba con una acumulación de TRAIL-R2 en compartimentos intracelulares. Además observamos, cómo la inhibición de la activación de caspasa-8 inducida por TRAIL, se encuentra directamente relacionada con la disminución en los niveles de TRAIL-R2 en la superficie celular. En este sentido, se ha descrito que una reducción en los niveles en la superficie celular de los receptores pro-apoptóticos de TRAIL, es suficiente para que células tumorales adquieran resistencia a la apoptosis inducida por TRAIL, sin importar el estado de otros componentes implicados en la señalización pro-apoptótica (Twomey et al. 2015).

Entre los posibles mecanismos implicados en la reducción de los niveles de receptores pro-apoptóticos en la superficie celular, encontramos dos posibilidades. Por un lado, la expresión de los receptores de muerte en la superficie celular depende de la translocación de la proteína desde el retículo endoplasmático-aparato de Golgi (RE-Golgi) hacia la membrana plasmática (Schneider-Brachert et al. 2013). TGF- β podría estar bloqueando o inhibiendo el tráfico de proteínas al exterior impidiendo su localización en la superficie celular y con ello la apoptosis inducida por TRAIL. De hecho, se ha descrito que fallos en el transporte de los receptores de muerte desde la red trans-Golgi hacia la membrana plasmática están implicados en la resistencia de diferentes líneas celulares a TRAIL (Símová et al. 2008). Sin embargo, el hecho de que TGF- β pueda estar afectando o no a esta maquinaria de transporte reduciendo así los niveles de TRAIL-R2 en células humanas epiteliales de mama, es un asunto que requiere de una investigación en mayor profundidad.

Por otro lado, también se ha demostrado en diversas líneas tumorales que la resistencia a TRAIL puede deberse a un proceso de internalización de los receptores de TRAIL, que puede producirse de manera constitutiva o mediada por la unión del ligando de muerte, disminuyendo la capacidad de TRAIL para inducir apoptosis (Zhang & Zhang 2008; Akazawa et al. 2009; Zhang et al. 2009), a diferencia de lo que se ha descrito para los receptores de TNF α y de FasL (Schneider-Brachert et al. 2013).

En la búsqueda del mecanismo implicado en la reducción de los niveles de expresión en la superficie de TRAIL-R2 observado en células epiteliales de mama tratadas con TGF- β , observamos que TGF- β inducía la expresión de TRAIL, lo que nos permitió plantear la posibilidad de si este aumento en la expresión del ligando de muerte, podría estar mediando bien la internalización que comentábamos anteriormente o si podría estar ejerciendo un efecto desensibilizador sobre TRAIL-R2 (Flusberg et al. 2013). Sin embargo, ni el silenciamiento de la expresión de TRAIL con RNAs de interferencia ni el tratamiento con TRAIL-R2-Fc inhibió la reducción de los niveles de TRAIL-R2 en células tratadas con TGF- β , lo que excluye la posibilidad de una internalización inducida por ligando como mecanismo que explique la acumulación intracelular del receptor de muerte.

Además de la disminución en los niveles de expresión de TRAIL-R2, hemos demostrado que el tratamiento con TGF- β , potencia el flujo autofágico, que va a contrarrestar la activación de apoptosis por TRAIL. En conjunto, nuestros resultados muestran en células humanas epiteliales de mama, una nueva función citoprotectora de TGF- β , que se opone a la inducción de apoptosis por TRAIL, favoreciendo la supervivencia mediada por un incremento en el flujo autofágico. En contraste, en células de carcinoma hepatocelular y mamario, se ha observado que la activación de autofagia por TGF- β participa en la inhibición del crecimiento y favorece la apoptosis (Kiyono et al. 2009; Suzuki et al. 2010), lo que sugiere la existencia de una regulación diferencial de la señalización dependiente de TGF- β en células normales y tumorales.

En células endoteliales humanas, se ha descrito que la autofagia inducida por TGF- β favorece la supervivencia celular a través de un mecanismo que implica la activación transcripcional del gen de Beclina1 (Pan et al. 2015). Además, previamente nuestro grupo también ha demostrado el papel citoprotector de la autofagia en la inhibición de la apoptosis inducida por TRAIL, en células humanas epiteliales de mama (Herrero-Martín et al. 2009) y en otros sistemas se ha observado cómo la autofagia puede promover la degradación de la caspasa-8 activa previniendo la muerte inducida por TRAIL (Hou et al. 2010). Actualmente desconocemos el mecanismo por el que la autofagia inducida por TGF- β protege de la apoptosis inducida por TRAIL en nuestro sistema. Se ha descrito en células tumorales de mama, que la autofagia también puede participar en la regulación de la dinámica de los receptores de TRAIL, (Di et al. 2013), sin embargo, nosotros no observamos relación entre los niveles de TRAIL-R2/DR5 en la superficie celular y la inducción de autofagia.

Por último, se ha descrito que TGF- β es un potente inductor de transición epitelio-mesénquima (EMT) en diferentes sistemas, proceso que en células tumorales contribuye a la adquisición de un fenotipo metastásico (Massagué 2012; Fabregat et al. 2014).

Recientemente se ha demostrado que, la disminución en los niveles de E-caderina como consecuencia de la inducción de un proceso de EMT estimulado por TGF- β o por otros tratamientos, favorece la resistencia de diversas líneas celulares tumorales a la apoptosis inducida por TRAIL (Lu et al. 2014). En el presente trabajo, nosotros demostramos que en células no tumorales epiteliales de mama, la adquisición de un fenotipo de resistencia a TRAIL inducido por TGF- β precede a la reducción de la expresión de E-caderina que acompaña a la activación de un proceso de EMT, ya que ni la inhibición mediante siRNA de interferencia de la expresión de E-caderina, ni la incubación con un anticuerpo bloqueante de la función de E-caderina, es suficiente para conferir resistencia a la apoptosis inducida por TRAIL en células MCF10A dependientes de EGF. Además, células NeuT que presentan fenotipo mesenquimal y han perdido la expresión de E-caderina, son extremadamente sensibles a la acción de TRAIL y el tratamiento con TGF- β inhibe igualmente la apoptosis inducida por TRAIL, lo que proporciona nuevas evidencias sobre la existencia de un mecanismo de resistencia a TRAIL inducido por TGF- β independiente de E-caderina y de nuevo sugiere que el mecanismo de activación de apoptosis por TRAIL claramente difiere entre células tumorales y no tumorales.

En resumen, nuestros resultados indican que en células no tumorales epiteliales de mama, la regulación de la sensibilidad a TRAIL inducida por TGF- β se produce a través de un mecanismo independiente de la activación de un programa de EMT. Asimismo, nuestros datos revelan la existencia un mecanismo pleiotrópico de resistencia a TRAIL que requiere de la activación de una autofagia citoprotectora y de la reducción de los niveles del receptor pro-apoptóticos de TRAIL que junto con otros factores tales como aumento en los niveles de proteínas antiapoptóticas como FLIP puede contribuir a la regulación de una sensibilidad a TRAIL diferencial entre células normales y tumorales.

CAPITULO IV: Papel del sistema TRAIL en el destino celular tras estrés en el retículo endoplasmático.

El retículo endoplasmático (RE) es un orgánulo fundamental para la regulación de la ruta secretora de proteínas y como almacén de calcio. Alteraciones fisiológicas o patológicas en el ambiente celular y fluctuaciones en los niveles de nutrientes, pueden perturbar la capacidad de plegamiento de proteínas del RE, provocando una acumulación de proteínas mal plegadas que denominamos como estrés en el RE (Wang & Kaufman 2014).

La habilidad de las células para detectar y responder al estrés de su entorno es esencial para el mantenimiento de la homeostasis y va a determinar el destino celular. El microambiente tumoral se caracteriza por una pobre vascularización, bajos niveles de oxígeno, privación de nutrientes y pH ácido, circunstancias que provocan la acumulación de proteínas mal plegadas, induciendo estrés en el RE y la activación de la UPR, que en primera instancia actuará como mecanismo de adaptación al estrés promoviendo la supervivencia de las células tumorales, incrementando su agresividad y la resistencia a agentes quimioterapéuticos (Wang & Kaufman 2014; Clarke et al. 2014). Sin embargo, si el estrés se prolonga o se intensifica será esta misma respuesta, la que va a activar la maquinaria apoptótica y con ello la muerte celular (Jäger et al. 2012). En base a esto, se ha propuesto la regulación de estrés en el RE como terapia antitumoral, de manera que tanto la inhibición como la inducción de la activación de la UPR, va a favorecer específicamente la muerte de células tumorales que requieren de esta respuesta para sobrevivir (Healy et al. 2009).

Los tumores de mama triple negativos todavía suponen un reto importante ya que no pueden ser tratados con las terapias dirigidas con agentes anti Her2 o con terapia hormonal, debido a la ausencia de receptores de estrógenos, progesterona y del factor humano de crecimiento epidérmico, por lo que el único tratamiento posible es la quimioterapia convencional y se necesitan encontrar nuevas aproximaciones terapéuticas (Schneider et al. 2008).

En este trabajo, hemos analizado el efecto de estímulos inductores de estrés en el RE, en células tumorales de mama triple negativas y lumbinales. Nuestros resultados mostraron una mayor sensibilidad a la apoptosis inducida por estímulos de estrés en el RE, de varias líneas tumorales de mama triple negativas (TNBC, *del inglés, Triple Negative Breast Cancer Cells*) respecto a líneas tumorales de mama lumbinales, mediante un mecanismo que implica la activación de la ruta intrínseca y extrínseca de apoptosis.

Recientemente se ha descrito, que las células mesenquimales secretan una mayor cantidad de proteínas, por lo que presentan unos niveles basales de activación de la UPR, necesarios para la

supervivencia celular y por esta razón, son más sensibles a estrés en el RE que células control epiteliales. Estos mismos resultado se reproducían en modelos de líneas celulares tumorales de mama triple negativos frente a células tumorales luminales (Feng et al. 2014).

Generalmente, la muerte inducida por estrés en el RE se produce a través de la regulación de proteínas de la familia Bcl-2 (Bim, Noxa y Puma) e implica una apoptosis mitocondrial (Urrea et al. 2013). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que el estrés en el RE también puede inducir la activación de los receptores pro-apoptóticos de TRAIL y la activación de caspasa-8 (Yamaguchi & Wang 2004; Martín-Pérez et al. 2014; Lu et al. 2014).

Datos previos del grupo, demostraban que células MCF10A que sobreexpresan una forma mutada y constitutivamente activa del oncogén ErbB2, presentan una activación mayor en respuesta a estrés en el RE de la ruta de PERK/ATF4/CHOP que las células control, que induce un incremento en la expresión de TRAIL-R2 y favorece la activación de la ruta apoptótica mitocondrial de forma dependiente de caspasa-8. Además, la inhibición de la actividad de las rutas de MAPK/ERK, AKT y mTOR prevenía la desregulación de la ruta PERK/ATF4/CHOP/TRAIL-R2 y la sensibilidad de las células transformadas con la forma mutante de ErbB2 (Martín-Pérez et al. 2014). Asimismo, se ha descrito en diversas líneas celulares tumorales, que estímulos persistentes de estrés en el RE sensibilizan a la apoptosis a través de la inducción de TRAIL-R2 dependiente de UPR y la activación de caspasa-8 (Lu et al. 2014). Nuestros resultados en cambio muestran, que el silenciamiento mediante RNA de interferencia de caspasa-8, no es suficiente para bloquear la inducción de apoptosis inducida por estímulos de estrés en el RE, lo que nos sugería la existencia de un mecanismo de muerte inducida por estrés en el RE, diferente al previamente descrito.

Dada la implicación de la mitocondria en la apoptosis inducida en respuesta a estímulos de estrés en células tumorales epiteliales de mama, realizamos un estudio por RT-MLPA de la expresión génica de genes relacionados con la apoptosis, entre los que se incluían miembros de la familia Bcl-2, sin obtener diferencias significativas en la expresión de éstos entre ambas líneas en respuesta a un tratamiento con taspigargina. No obstante, se observaron sutiles diferencias en la inducción de los RNA mensajero de Noxa y Puma, así como mayores niveles basales en la expresión de RNA mensajeros de genes de las BH3-only: Noxa, BNIP2 y BAX. Las proteínas BH3-only: Noxa, Bim y Puma se han descrito como las principales implicadas en la muerte celular inducida por estrés en el RE (Puthalakath et al. 2007; Li et al. 2006). Sin embargo y a pesar de su inducción en respuesta a tratamientos inductores de estrés en el RE, la reducción de los niveles de expresión de estas proteínas tampoco es suficiente para reducir la sensibilidad de estas células a estrés en el RE.

Finalmente, demostramos que la inducción de estrés en el RE, activa las rutas apoptóticas extrínseca y mitocondrial, siendo necesaria la inhibición simultánea de ambas, para bloquear la muerte celular.

En cuanto al mecanismo responsable de esta sensibilidad diferencial a estrés en el RE entre líneas tumorales de mama triple negativas y líneas tumorales lumbinales, nuestros datos muestran una activación diferencial de ATF4 y del procesamiento de XBP1 entre células triple negativas versus células lumbinales. Sin embargo, el silenciamiento mediante RNA de interferencia de las proteínas fundamentales de cada uno de los brazos de la UPR, no redujo la sensibilidad a agentes inductores de estrés en el RE, lo que sugería que podrían estar tan solo regulando una de las rutas apoptóticas.

Tanto ATF4/CHOP como IRE-1 se han descrito como mediadores de la muerte celular inducida por estrés en el RE a través de la ruta mitocondrial (Shore et al. 2011; Logue et al. 2013), que implica a los miembros de la familia Bcl-2: Bak y Bax responsables de la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP) (Tait & Green 2010).

La inducción de CHOP, es uno de los principales eventos implicados en la activación de apoptosis en respuesta a estrés en el RE. En este sentido, uno de los mecanismos de muerte celular mejor estudiados es la regulación de los niveles de diversos miembros de la familia Bcl-2. De esta manera, en respuesta a estrés en el RE, CHOP puede reducir la expresión de Bcl-2 sensibilizando a la apoptosis (McCullough et al. 2001) o puede incrementar la expresión de algunos miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2 (proteínas BH3-only), como Bim, Puma y Noxa (Puthalakath et al. 2007; Reimertz et al. 2003). Por su parte, la ruta de IRE-1 aunque principalmente se encuentra relacionada con el mantenimiento de la supervivencia celular, incrementando la regulación de genes implicados en el plegamiento de proteínas (Lin et al. 2007), también se ha descrito que puede inducir apoptosis a través de la activación de JNK (Urano et al. 2000; Han et al. 2009).

Nuestros resultados muestran que la ruta de ATF4-CHOP no está regulando la activación de la ruta mitocondrial, sino que está actuando a nivel de activación de la ruta extrínseca de apoptosis, observándose únicamente una inhibición de la sensibilidad a taspigargina, cuando se silencian simultáneamente las proteínas ATF4 y Noxa. De esta manera, demostramos que la activación diferencial en respuesta a estrés en el RE, de la ruta ATF4/CHOP induce un incremento en los niveles de expresión de TRAIL-R2 que provoca una mayor activación de caspasa-8 y de la ruta apoptótica extrínseca. Estos datos concuerdan con estudios previos, en los que se demuestra que el estrés en el RE induce muerte celular mediada por un incremento en la expresión de los receptores de muerte (Iurlaro & Muñoz Pinedo 2015). En este sentido, se ha descrito en diversas líneas celulares tumorales que el estrés en el RE inducido por un tratamiento con taspigargina, provoca muerte celular mediada por CHOP que va a regular la actividad del promotor de TRAIL-R2 incrementando sus niveles de

expresión e induciendo apoptosis dependiente de caspasa-8 (Yamaguchi & Wang 2004; Martín-Pérez et al. 2014; Lu et al. 2014). Datos previos del grupo mostraban como el tratamiento con tunicamicina y taspigargina, sensibilizaba a líneas celulares humanas, transformadas o no transformadas a la apoptosis inducida por TRAIL (Martín-Pérez et al. 2012). Sin embargo, el mecanismo de muerte inducido por estrés en el RE es independiente del ligando de TRAIL (Martín-Pérez et al. 2014; Lu et al. 2014). Se ha demostrado, que la expresión ectópica de TRAIL-R2 es suficiente para inducir apoptosis en ausencia de ligando (Sheridan et al. 1997). Además, se ha descrito que receptores de la familia de TNF pueden formar el DISC de manera independiente de ligando, mediante la asociación homotípica de los receptores a través de los dominios PLAD (Sheridan et al. 1997).

En contraste y a pesar de las marcadas diferencias observadas en la activación de la ruta de IRE-1 en líneas tumorales de mama triple negativas frente a líneas tumorales luminales, no hemos conseguido revelar el papel de IRE-1 en la inducción de apoptosis por estrés en el RE en éstas células, ya que el silenciamiento conjunto de IRE-1 con caspasa-8 o Noxa no mostró efecto alguno, lo que sugiere que no está participando en la activación de ninguna de las rutas apoptóticas. Estos datos, concuerdan con los previamente descritos en el modelo de células ErbB2, en el que tras un tratamiento con taspigargina se observaba una activación más prolongada de la ruta de Ire-1, aunque la señalización de apoptosis era independiente de esta ruta (Martín-Pérez et al. 2014). Por otra parte, recientemente se ha descrito, que la activación de la UPR como consecuencia de un estímulo de estrés en el RE persistente, además de promover el incremento en la expresión de TRAIL-R2 mediado por CHOP, también induce la activación de la ruta de IRE1 α , que va a contrarrestar el aumento en la expresión de TRAIL-R2, actuando como mecanismo anti-apoptótico que proporciona un periodo de tiempo mayor para la adaptación (Lu et al. 2014).

En cuanto a la activación de la ruta intrínseca, nuestros resultados muestran unos niveles basales e inducidos de Noxa en respuesta a estrés en el RE responsables de la sensibilización a apoptosis de células tumorales triple negativas en respuesta a taspigargina. Sin embargo, desconocemos el mecanismo por el que el estrés en el RE regula la apoptosis mediada por Noxa en estas células. La sobreexpresión de Mcl-1, se ha descrito en diversos tumores sólidos y hematológicos y es uno de los genes más frecuentemente amplificados en tumores humanos (Beroukhim et al. 2010; Wei et al. 2012). Mcl-1 es una proteína anti-apoptótica de vida media corta, cuya estabilidad se ve rápidamente comprometida por problemas en la maquinaria responsable de la traducción de proteínas. En este sentido se ha demostrado que en respuesta a un tratamiento con taspigargina, la activación de la ruta de PERK provoca la inhibición de la síntesis general de proteínas, ocasionando una disminución en los niveles de Mcl-1 (Allagnat et al. 2011). Además se ha descrito en diversas líneas tumorales de mama triple negativas, una amplificación de la expresión de Mcl-1 que correlaciona con la mayor

resistencia a apoptosis (Goodwin et al. 2015). Por su parte, Noxa es una proteína BH3-only pro-apoptótica que interacciona específicamente con Mcl-1 en respuesta a estímulos apoptóticos induciendo la degradación por el proteasoma de Mcl-1 (Czabotar et al. 2007). Por ello nosotros proponemos que en condiciones de estrés en el RE persistente, se favorece la transcripción de Noxa que va a secuestrar a Mcl-1, permitiendo la oligomerización de Bax y Bak en la mitocondria y con ello la liberación de citocromo-c y la apoptosis. Sin embargo, debido a los elevados niveles basales de Noxa presentes en las células TNBC: MDA-MB231, nos preguntamos ¿Por qué estas células requieren de un estímulo externo para la inducción de muerte por la vía mitocondrial? Estudios previos en la literatura muestran que en líneas celulares leucémicas que proliferan activamente y células T primarias, CDK5 de manera dependiente de glucosa fosforila a Noxa en la serina 13 (S¹³) y lo que provoca que éste se encuentre secuestrado en el citosol (Lowman et al. 2010). Nuestra hipótesis propone, que en condiciones basales Noxa estaría secuestrado o retenido en otro compartimento celular y tan solo cuando se produce un estímulo de estrés lo suficientemente fuerte, entonces viaja a la mitocondria secuestrando y degradando a Mcl-1 y permitiendo la activación de la apoptosis por la ruta intrínseca. No obstante esta es una hipótesis que requiere todavía de un estudio en mayor profundidad.

Por último, a diferencia del mecanismo de muerte por estrés en el RE completamente dependiente de caspasa-8, descrito en líneas tumorales de diverso origen y en un modelo de transformación oncogénica por ErbB2 (Lu et al. 2014; Martín-Pérez et al. 2014). Nuestros resultados indican, la necesidad de bloquear simultáneamente la activación de ambas rutas, que convergen en la permeabilización de la mitocondria, para inhibir la apoptosis por estrés en el RE. Por ello y dado que la regulación de los niveles de TRAIL-R2 por CHOP se confirma en todos los estudios, analizamos el comportamiento de la proteína cFLIP, observando los niveles de cFLIP(L) permanecían prácticamente invariables en respuesta al tratamiento con taspargina, al contrario de lo que ocurría en células MCF10-A NeuT (Martín-Pérez et al. 2014).

La señalización apoptótica, se inhibe a nivel del DISC por la proteína cFLIP (Irmmler et al. 1997), por lo que nos preguntamos si la presencia de la proteína cFLIP o el retraso en su degradación en respuesta a estrés en el RE, podría estar inhibiendo la activación de la ruta extrínseca de apoptosis a pesar del incremento en los niveles de TRAIL-R2. De acuerdo con esto, nuestros datos confirman que en líneas tumorales de mama, la ausencia de la proteína cFLIP(L), favorece la apoptosis inducida por taspargina, la cual se produce en un menor periodo de tiempo y es completamente dependiente de la inhibición de la ruta extrínseca y de la activación de la ruta de ATF4-CHOP. No obstante, aún no se conoce el mecanismo responsable de la regulación de los niveles de FLIP en condiciones de estrés en el RE en líneas tumorales de mama.

De esta manera, proponemos que en líneas tumorales de mama, el mecanismo implicado en la inducción de apoptosis por estrés en el RE consta de dos etapas. En primer lugar, se produce una rápida activación de la UPR que va a provocar un incremento en los niveles de TRAIL-R2 mediado por la ruta de ATF4/CHOP permitiendo la activación de caspasa-8 en el DISC y la apoptosis. Sin embargo, las líneas tumorales de mama han adquirido la capacidad de mantener elevados por más tiempo los niveles de la proteína anti-apoptótica cFLIP, lo que retrasa la activación del DISC y favorece la supervivencia celular proporcionando tiempo para que la célula trate de solventar la situación de estrés y se adapte. No obstante, si el estrés perdura se activa un segundo mecanismo que implica la activación de la ruta mitocondrial mediado por la inducción de una proteína pro-apoptótica BH3-only como Noxa, que junto con una reducción en los niveles de cFLIP promueve la activación de la ruta extrínseca e inducen la muerte celular.

Por tanto, este estudio muestran un nuevo mecanismo de muerte celular inducido por estrés en el RE en células tumorales de mama y proporcionan un papel fundamental a la proteína anti-apoptótica cFLIP como un importante regulador del destino celular.

Conclusiones

CONCLUSIONES

A continuación se exponen las conclusiones obtenidas a partir de los resultados mostrados en el presente trabajo.

1. En células humanas epiteliales de mama, TRAIL activa las rutas de señalización de MAPK/ERK y PI3K/AKT de manera dependiente de caspasa-8.
2. Estas rutas de señalización desempeñan un papel dual en la regulación de la apoptosis por TRAIL en células no tumorales, pro-apoptótico regulando negativamente los niveles de cFLIP(L) y anti-apoptótico reduciendo la formación del DISC en respuesta a TRAIL.
3. En células tumorales, la activación de éstas rutas de señalización presenta un papel fundamentalmente anti-apoptótico y existe una regulación diferencial de los niveles de cFLIP(L) y de la sensibilidad a TRAIL entre líneas normales y tumorales.
4. La transformación de células humanas epiteliales de mama con una forma mutada y constitutivamente activa del oncogén ErbB2/Neu/Her2 (NeuT), promueve la adquisición de un fenotipo tumorigénico e incrementa la sensibilidad a la apoptosis inducida por TRAIL de manera independiente del estado mesenquimal de éstas.
5. La mayor activación de las rutas de MAPK/ERK y PI3K/AKT favorece la apoptosis inducida por TRAIL en células MCF10A pNeuT a través de la regulación negativa de los niveles de FLIP(L). La ruta de mTOR también afecta a la sensibilidad a TRAIL aunque mediante un mecanismo independiente de cFLIP.
6. En células humanas no tumorales epiteliales de mama, TGF- β reduce la sensibilidad a la apoptosis inducida por TRAIL, mediante la inducción de un mecanismo de autofagia citoprotectora y la reducción específica de los niveles de TRAIL-R2 en la superficie celular.
7. El mecanismo de resistencia a TRAIL inducido por TGF- β es independiente de los niveles endógenos de TRAIL así como de la presencia de la proteína E-caderina y del estado mesenquimal de las células.
8. Las líneas tumorales de mama triple negativas se sensibilizan a la apoptosis inducida por estrés en el RE a través de un mecanismo que implica la activación de la ruta extrínseca de TRAIL y de la ruta mitocondrial.

9. La activación de la ruta de ATF4-CHOP es responsable del incremento en la expresión de TRAIL-R2 y de la consiguiente activación de caspasa-8. Por su parte, la activación de la ruta mitocondrial depende de la presencia de la proteína BH3-only Noxa.

10. En células tumorales de mama, los niveles de cFLIP van a regular el destino celular en condiciones de estrés en el RE.

Bibliografía

- Abada, A. & Elazar, Z., 2014. Getting ready for building: signaling and autophagosome biogenesis. *EMBO reports*, 15(8), pp.839–852.
- Acloque, H. et al., 2009. Epithelial-mesenchymal transitions: The importance of changing cell state in development and disease. *Journal of Clinical Investigation*, 119(6), pp.1438–1449.
- Adams, C. et al., 2008. Structural and functional analysis of the interaction between the agonistic monoclonal antibody Apomab and the proapoptotic receptor DR5. *Cell Death and Differentiation*, 15(4), pp.751–761.
- Akazawa, Y. et al., 2009. Death receptor 5 internalization is required for lysosomal permeabilization by TRAIL in malignant liver cell lines. *Gastroenterology*, 136(7), pp.2365–2376–7.
- Akhurst, R.J. & Hata, A., 2012. Targeting the TGF β signalling pathway in disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11(10), pp.790–811.
- Alappat, E.C., Volkland, J. & Peter, M.E., 2003. Cell cycle effects by C-FADD depend on its C-terminal phosphorylation site. *The Journal of biological chemistry*, 278(43), pp.41585–8.
- Algeciras-Schimmich, A. et al., 1999. Cell cycle-dependent regulation of FLIP levels and susceptibility to Fas-mediated apoptosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 162(9), pp.5205–5211.
- Al-Hajj, M. et al., 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), pp.3983–8.
- Al-Hajj, M. & Clarke, M.F., 2004. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene*, 23(43), pp.7274–7282.
- Allagnat, F. et al., 2011. Mcl-1 downregulation by pro-inflammatory cytokines and palmitate is an early event contributing to β -cell apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 18(2), pp.328–337.
- Allan, L.A. et al., 2003. Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK. *Nature Cell Biology*, 5(7), pp.647–654.
- Allan, L.A. & Clarke, P.R., 2009. Apoptosis and autophagy: Regulation of caspase-9 by phosphorylation. *FEBS Journal*, 276(21), pp.6063–6073.
- de Almagro, M.C. & Vucic, D., 2015. Necroptosis: Pathway diversity and characteristics. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 39, pp.56–62.

- Almasan, A. & Ashkenazi, A., 2003. Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy. *Cytokine & growth factor reviews*, 14(3–4), pp.337–48.
- Alvarado-Kristensson, M. et al., 2004. p38-MAPK signals survival by phosphorylation of caspase-8 and caspase-3 in human neutrophils. *The Journal of experimental medicine*, 199(4), pp.449–58.
- Andrechek, E.R. et al., 2000. Amplification of the neu/erbB-2 oncogene in a mouse model of mammary tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(7), pp.3444–3449.
- Anel, A. et al., 2007. Apo2L/TRAIL and immune regulation. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 12, pp.2074–84.
- Arap, M.A. et al., 2004. Cell surface expression of the stress response chaperone GRP78 enables tumor targeting by circulating ligands. *Cancer cell*, 6(3), pp.275–84.
- Arnoux, V. et al., 2008. Erk5 controls Slug expression and keratinocyte activation during wound healing. *Molecular biology of the cell*, 19(11), pp.4738–49.
- Arribas, J. et al., 2011. p95HER2 and breast cancer. *Cancer Research*, 71(5), pp.1515–1519.
- Arteaga, C.L. et al., 2011. Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 9(1), pp.16–32.
- Ashkenazi, A., 2008. Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonists. *Nature reviews. Drug discovery*, 7(12), pp.1001–12.
- Ashkenazi, A. et al., 1999. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *The Journal of clinical investigation*, 104(2), pp.155–62.
- Ashkenazi, A., 2015. Targeting the extrinsic apoptotic pathway in cancer : lessons learned and future directions. , 125(2), pp.487–489.
- Ashkenazi, A. et al., 2008. To kill a tumor cell: the potential of proapoptotic receptor agonists. *The Journal of clinical investigation*, 118(6), pp.1979–90.
- Ashkenazi, A. & Dixit, V.M., 1999. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Current opinion in cell biology*, 11(2), pp.255–60.
- Ashkenazi, A. & Dixit, V.M., 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science (New York, N.Y.)*, 281(5381), pp.1305–1308.

- Auf, G. et al., 2010. Inositol-requiring enzyme 1alpha is a key regulator of angiogenesis and invasion in malignant glioma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(35), pp.15553–8.
- Austin, C.D. et al., 2006a. Death-receptor activation halts clathrin-dependent endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(27), pp.10283–8.
- Azijli, K. et al., 2012. Kinome profiling of non-canonical TRAIL signaling reveals RIP1-Src-STAT3 dependent invasion in resistant non-small cell lung cancer cells. *Journal of Cell Science*, pp.4651–4661.
- Azijli, K. et al., 2013. Non-canonical kinase signaling by the death ligand TRAIL in cancer cells: discord in the death receptor family. *Cell death and differentiation*, 20(7), pp.858–68.
- B'chir, W. et al., 2013. The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic acids research*, 41(16), pp.7683–99.
- Baekström, D., Lu, P.J. & Taylor-Papadimitriou, J., 2000. Activation of the α 2 β 1 integrin prevents c-erbB2-induced scattering and apoptosis of human mammary epithelial cells in collagen. *Oncogene*, 19(40), pp.4592–603.
- Baehrecke, E.H., 2005. Opinion: Autophagy: dual roles in life and death? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(6), pp.505–510.
- Bakin, A. V et al., 2000. Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *The Journal of biological chemistry*, 275(47), pp.36803–10.
- Barrallo-Gimeno, A. & Nieto, M.A., 2005. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development*, 132(14).
- Di Bartolomeo, S. et al., 2010. The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy. *The Journal of cell biology*, 191(1), pp.155–68.
- Baumann, O. & Walz, B., 2001. Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains. *International Review of Cytology*, 205, pp.149–214.
- Vanden Berghe, T. et al., 2014. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15(2), pp.135–47.

- Beroukhir, R. et al., 2010. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature*, 463(7283), pp.899–905.
- Bertolotti, A. et al., 2000. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nature cell biology*, 2(6), pp.326–32.
- Bertrand, M.J.M. et al., 2008. cIAP1 and cIAP2 Facilitate Cancer Cell Survival by Functioning as E3 Ligases that Promote RIP1 Ubiquitination. *Molecular Cell*, 30(6), pp.689–700.
- Bissel, M.J. & Radisky, D., 2001. Putting tumors in context. *Nature Reviews Cancer*, 1(1), pp.46–54.
- Boatright, K.M. et al., 2004. Activation of caspases-8 and -10 by FLIP(L). *The Biochemical journal*, 382(Pt 2), pp.651–7.
- Boatright, K.M. & Salvesen, G.S., 2003. Mechanisms of caspase activation. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(6), pp.725–731.
- Bobrovnikova-Marjon, E. et al., 2010. PERK promotes cancer cell proliferation and tumor growth by limiting oxidative DNA damage. *Oncogene*, 29(27), pp.3881–95.
- Bodmer, J.L., Meier, P., et al., 2000. Cysteine 230 is essential for the structure and activity of the cytotoxic ligand TRAIL. *The Journal of biological chemistry*, 275(27), pp.20632–7.
- Bodmer, J.L., Holler, N., et al., 2000. TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nature cell biology*, 2(4), pp.241–3.
- Bodmer, J.-L., Schneider, P. & Tschopp, J., 2002. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends in biochemical sciences*, 27(1), pp.19–26.
- Boya, P. et al., 2005. Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Molecular and cellular biology*, 25(3), pp.1025–40.
- Boya, P., Reggiori, F. & Codogno, P., 2013. Emerging regulation and functions of autophagy. *Nature Cell Biology*, 15(7), pp.713–720.
- Braakman, I. & Balleid, N.J., 2011. Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum. *Annual review of biochemistry*, 80, pp.71–99.
- Bravo, R. et al., 2013. Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration. *International review of cell and molecular biology*, 301, pp.215–90.

- Brown, D.A. & London, E., 1998. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annual review of cell and developmental biology*, 14, pp.111–36.
- Budd, R.C., Yeh, W.-C. & Tschopp, J., 2006. cFLIP regulation of lymphocyte activation and development. *Nature Reviews Immunology*, 6(3), pp.196–204.
- Burke, S., Smith, L. & Smith, J., 2010. cIAP1 cooperatively inhibits procaspase-3 activation by the caspase-9 apoptosome. *Journal of Biological Chemistry*.
- de Caestecker, M., 2004. The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. *Cytokine & growth factor reviews*, 15(1), pp.1–11.
- Celli, J. & Tsolis, R.M., 2014. Bacteria, the endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: friends or foes? *Nature Reviews Microbiology*, 13(2), pp.71–82.
- Chaffer, C.L. et al., 2013. Poised chromatin at the ZEB1 promoter enables breast cancer cell plasticity and enhances tumorigenicity. *Cell*, 154(1), pp.61–74.
- Chan, F.K.-M., 2007. Three is better than one: Pre-ligand receptor assembly in the regulation of TNF receptor signaling. *Cytokine*, 37(2), pp.101–107.
- Chang, N.C. et al., 2010. Antagonism of Beclin 1-dependent autophagy by BCL-2 at the endoplasmic reticulum requires NAF-1. *The EMBO journal*, 29(3), pp.606–18.
- Chaudhary, P.M. et al., 1997. Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. *Immunity*, 7(6), pp.821–30.
- Chea, H.K., Wright, C. V & Swalla, B.J., 2005. Nodal signaling and the evolution of deuterostome gastrulation. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 234(2), pp.269–78.
- Chen, X. et al., 2014. XBP1 promotes triple-negative breast cancer by controlling the HIF1 α pathway. *Nature*, 508(7494), pp.103–7.
- Chen, X., Shen, J. & Prywes, R., 2002. The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *The Journal of biological chemistry*, 277(15), pp.13045–52.
- Cheng, G.Z. et al., 2007. Twist transcriptionally up-regulates AKT2 in breast cancer cells leading to increased migration, invasion, and resistance to paclitaxel. *Cancer research*, 67(5), pp.1979–87.

- Cheng, Q. et al., 2014. A signature of epithelial-mesenchymal plasticity and stromal activation in primary tumor modulates late recurrence in breast cancer independent of disease subtype. *Breast cancer research : BCR*, 16(4), p.407.
- Chevet, E., Hetz, C. & Samali, A., 2015. Endoplasmic Reticulum Stress-Activated Cell Reprogramming in Oncogenesis. *Cancer discovery*, 5(6), pp.586–597.
- Chinnaiyan, A.M. et al., 1995. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of fas and initiates apoptosis. *Cell*, 81(4), pp.505–512.
- Chipuk, J.E. et al., 2010. The BCL-2 Family Reunion. *Molecular Cell*, 37(3), pp.299–310.
- Cho, Y. et al., 2009. Phosphorylation-Driven Assembly of the RIP1-RIP3 Complex Regulates Programmed Necrosis and Virus-Induced Inflammation. *Cell*, 137(6), pp.1112–1123.
- Choi, W.Y. et al., 2009. Sanguinarine sensitizes human gastric adenocarcinoma AGS cells to TRAIL-mediated apoptosis via down-regulation of AKT and activation of caspase-3. *Anticancer research*, 29(11), pp.4457–65.
- Ciechomska, I.A. et al., 2009. Bcl-2 complexed with Beclin-1 maintains full anti-apoptotic function. *Oncogene*, 28(21), pp.2128–2141.
- Citri, A. & Yarden, Y., 2006. EGF–ERBB signalling: towards the systems level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(7), pp.505–516.
- Clancy, L. et al., 2005. Preligand assembly domain-mediated ligand-independent association between TRAIL receptor 4 (TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(50), pp.18099–104.
- Clarke, H.J. et al., 2014. Endoplasmic reticulum stress in malignancy. *Cancer cell*, 25(5), pp.563–73.
- Clarke, P.G. & Clarke, S., 1996. Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena. *Anatomy and embryology*, 193(2), pp.81–99.
- Clemens, M.J., 2001. Initiation factor eIF2 alpha phosphorylation in stress responses and apoptosis. *Progress in molecular and subcellular biology*, 27, pp.57–89.
- Craene, B. De & Berx, G., 2013. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nature Reviews Cancer*, 13(2), pp.97–110.

- Crawford, E.D. & Wells, J.A., 2011. Caspase Substrates and Cellular Remodeling. *Annual Review of Biochemistry*, 80(1), pp.1055–1087.
- Creighton, C.J. et al., 2009. Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(33), pp.13820–5.
- Creighton, C.J., Chang, J.C. & Rosen, J.M., 2010. Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) in Tumor-Initiating Cells and Its Clinical Implications in Breast Cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 15(2), pp.253–260.
- Cretney, E. et al., 2002. Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 168(3), pp.1356–61.
- Cullinan, S.B. et al., 2003. Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Molecular and cellular biology*, 23(20), pp.7198–209.
- Cursi, S. et al., 2006. Src kinase phosphorylates Caspase-8 on Tyr380: a novel mechanism of apoptosis suppression. *The EMBO journal*, 25(9), pp.1895–905.
- Czabotar, P.E. et al., 2007. Structural insights into the degradation of Mcl-1 induced by BH3 domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(15), pp.6217–6222.
- Debnath, J. & Brugge, J.S., 2005. Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures. *Nature reviews. Cancer*, 5(9), pp.675–88.
- Debnath, J., Muthuswamy, S.K. & Brugge, J.S., 2003. Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. *Methods*, 30(3), pp.256–268.
- Degli-Esposti, M.A., Smolak, P.J., et al., 1997. Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *The Journal of experimental medicine*, 186(7), pp.1165–70.
- Degli-Esposti, M.A., Dougall, W.C., et al., 1997. The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity*, 7(6), pp.813–20.

- Degterev, A. & Yuan, J., 2008. Expansion and evolution of cell death programmes. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(5), pp.378–390.
- Derynck, R., Akhurst, R.J. & Balmain, A., 2001. TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nature Genetics*, 29(2), pp.117–129.
- Derynck, R., Muthusamy, B.P. & Saeteurn, K.Y., 2014. Signaling pathway cooperation in TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition. *Current opinion in cell biology*, 31, pp.56–66.
- Derynck, R. & Zhang, Y.E., 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. *Nature*, 425(6958), pp.577–584.
- DeSilva, D.R. et al., 1998. Inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase blocks T cell proliferation but does not induce or prevent anergy. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 160(9), pp.4175–81.
- Dewson, G. & Kluck, R.M., 2009. Mechanisms by which Bak and Bax permeabilise mitochondria during apoptosis. *Journal of Cell Science*, 122(16).
- Di, X., Zhang, G., Zhang, Y., Takeda, K. & Rosado, L. a R., 2013. Accumulation of autophagosomes in breast cancer cells induces TRAIL resistance through downregulation of surface expression of death receptors 4 and 5. *Oncotarget*, 4(9), pp.1349–1364.
- Dickens, L.S. et al., 2012. A Death Effector Domain Chain DISC Model Reveals a Crucial Role for Caspase-8 Chain Assembly in Mediating Apoptotic Cell Death. *Molecular Cell*, 47(2), pp.291–305.
- Dickens, L.S. et al., 2012. The “complexities” of life and death: Death receptor signalling platforms. *Experimental Cell Research*, 318(11), pp.1269–1277.
- Diehl, G.E. et al., 2004. TRAIL-R as a negative regulator of innate immune cell responses. *Immunity*, 21(6), pp.877–89.
- Dittrich, A. et al., 2014. The HER2 Signaling Network in Breast Cancer—Like a Spider in its Web. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 19(3–4), pp.253–270.
- Djavaheri-Mergny, M., Maiuri, M.C. & Kroemer, G., 2010. Cross talk between apoptosis and autophagy by caspase-mediated cleavage of Beclin 1. *Oncogene*, 29(12), pp.1717–1719.

- Djerbi, M. et al., 2001. Characterization of the human FLICE-inhibitory protein locus and comparison of the anti-apoptotic activity of four different flip isoforms. *Scandinavian journal of immunology*, 54(1–2), pp.180–9.
- Dontu, G. et al., 2003. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem / progenitor cells. *Genes & Development*, 17(10), pp.1253–1270.
- Duband, J.L. et al., 1995. Epithelium-Mesenchyme Transition during Neural Crest Development. *Cells Tissues Organs*, 154(1), pp.63–78.
- Dufey, E. et al., 2014. Cellular Mechanisms of Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Health and Disease. 1. An overview. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 307(7).
- Dufey, E., Urra, H. & Hetz, C., 2015. ER proteostasis addiction in cancer biology: Novel concepts. *Seminars in Cancer Biology*, 33, pp.40–47.
- Eccles, S.A., 2011. The epidermal growth factor receptor/Erb-B/HER family in normal and malignant breast biology. *The International Journal of Developmental Biology*, 55(7–8–9), pp.685–696.
- Eckelman, B.P., Salvesen, G.S. & Scott, F.L., 2006. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO reports*, 7(10), pp.988–94.
- Ehrhardt, H. et al., 2003. TRAIL induced survival and proliferation in cancer cells resistant towards TRAIL-induced apoptosis mediated by NF- κ B. *Oncogene*, 22(25), pp.3842–3852.
- Eilers, M. & Eisenman, R.N., 2008. Myc's broad reach. *Genes & Development*, 22(20), pp.2755–2766.
- Eldering, E. et al., 2003. Expression profiling via novel multiplex assay allows rapid assessment of gene regulation in defined signalling pathways. *Nucleic acids research*, 31(23), p.e153.
- Elgendy, M. et al., 2011. Oncogenic Ras-induced expression of Noxa and Beclin-1 promotes autophagic cell death and limits clonogenic survival. *Molecular cell*, 42(1), pp.23–35.
- Ellis, H.M. & Horvitz, H.R., 1986. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*, 44(6), pp.817–29.
- Ellis, R.E. & Horvitz, H.R., 1991. Two *C. elegans* genes control the programmed deaths of specific cells in the pharynx. *Development*, 112(2).
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), pp.495–516.

- Emery, J.G. et al., 1998. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *The Journal of biological chemistry*, 273(23), pp.14363–7.
- Eramo, A. et al., 2005. Inhibition of DNA Methylation Sensitizes Glioblastoma for Tumor Necrosis Factor–Related Apoptosis-Inducing Ligand–Mediated Destruction. *Cancer Research*, 65(24).
- Fabregat, I. et al., 2014. TGF-Beta Signaling in Cancer Treatment. *Current pharmaceutical design*, 20(August), pp.1–14.
- Fadok, V.A. et al., 1992. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 148(7), pp.2207–16.
- Fadok, V.A. et al., 2001. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *The Journal of biological chemistry*, 276(2), pp.1071–7.
- Fadok, V.A. et al., 1998. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell death and differentiation*, 5(7), pp.551–62.
- Falschlehner, C. et al., 2007. TRAIL signalling: Decisions between life and death. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(7), pp.1462–1475.
- Fanger, N.A. et al., 1999. Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *The Journal of experimental medicine*, 190(8), pp.1155–64.
- Feng, Y.-X. et al., 2014. Epithelial-to-mesenchymal transition activates PERK-eIF2 α and sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress. *Cancer discovery*, 4(6), pp.702–15.
- Feoktistova, M. et al., 2011. cIAPs Block Ripoptosome Formation, a RIP1/Caspase-8 Containing Intracellular Cell Death Complex Differentially Regulated by cFLIP Isoforms. *Molecular Cell*, 43(3), pp.449–463.
- Feoktistova, M. & Leverkus, M., 2015. Programmed necrosis and necroptosis signalling. *FEBS Journal*, 282(1), pp.19–31.
- Ferguson, K.M. et al., 2003. EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Molecular cell*, 11(2), pp.507–17.

- Finnberg, N., Klein-Szanto, A.J.P. & El-Deiry, W.S., 2008. TRAIL-R deficiency in mice promotes susceptibility to chronic inflammation and tumorigenesis. *The Journal of clinical investigation*, 118(1), pp.111–23.
- Di Fiore, P.P., Pierce, J.H., Kraus, M.H., et al., 1987. erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science (New York, N.Y.)*, 237(4811), pp.178–82.
- Di Fiore, P.P., Pierce, J.H., Fleming, T.P., et al., 1987. Overexpression of the human EGF receptor confers an EGF-dependent transformed phenotype to NIH 3T3 cells. *Cell*, 51(6), pp.1063–70.
- Fischer, K.R. et al., 2015. Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature*, 527(7579), pp.472–476.
- Flusberg, D. a et al., 2013. Cells surviving fractional killing by TRAIL exhibit transient but sustainable resistance and inflammatory phenotypes. *Molecular biology of the cell*, 24(14), pp.2186–200.
- Fritsche, H. et al., 2015. TRAIL-R2 promotes skeletal metastasis in a breast cancer xenograft mouse model. *Oncotarget*, 6(11), pp.9502–16.
- Frixen, U.H. et al., 1991. E-Cadherin-mediated Cell-Cell Adhesion Prevents Invasiveness of Human Carcinoma Cells. , 1(1), pp.173–185.
- Fuentes-Prior, P. & Salvesen, G.S., 2004. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *The Biochemical journal*, 384(Pt 2), pp.201–232.
- Gagliato, D.D.M. et al., 2016. Mechanisms of resistance and sensitivity to anti-HER2 therapies in HER2 + Breast Cancer.
- Galluzzi, L. et al., 2014. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell death and differentiation*, (2014), pp.1–16.
- Galluzzi, L. et al., 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation*, 19(1), pp.107–120.
- Galluzzi, L. & Kroemer, G., 2008. Necroptosis: A Specialized Pathway of Programmed Necrosis. *Cell*, 135(7), pp.1161–1163.
- Ganten, T.M. et al., 2004. Enhanced caspase-8 recruitment to and activation at the DISC is critical for sensitisation of human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis by chemotherapeutic drugs. *Cell Death and Differentiation*, 11, pp.S86–S96.

- Ganten, T.M. et al., 2005. Proteasome inhibition sensitizes hepatocellular carcinoma cells, but not human hepatocytes, to TRAIL. *Hepatology*, 42(3), pp.588–597.
- Gibson, E.M. et al., 2002. Epidermal Growth Factor Protects Epithelial-derived Cells from Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand-induced Apoptosis by Inhibiting Cytochrome c Release Epidermal Growth Factor Protects Epithelial-derived Cells from Tumor Necrosis. , pp.488–496.
- Gibson, S.B., 2004. Epidermal Growth Factor and Trail Interactions in Epithelial-Derived Cells. *Vitamins and Hormones*, 67, pp.207–227.
- Glücksmann, A., 1951. CELL DEATHS IN NORMAL VERTEBRATE ONTOGENY. *Biological Reviews*, 26(1), pp.59–86.
- Golks, A. et al., 2005. c-FLIPR, a new regulator of death receptor-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 280(15), pp.14507–13.
- Golstein, P. & Kroemer, G., 2007. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(1), pp.37–43.
- Gómez-Benito, M. et al., 2007. Membrane expression of DR4, DR5 and caspase-8 levels, but not Mcl-1, determine sensitivity of human myeloma cells to Apo2L/TRAIL. *Experimental Cell Research*, 313(11), pp.2378–2388.
- Gomis, R.R. et al., 2006. A FoxO-Smad synexpression group in human keratinocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(34), pp.12747–52.
- Gonzalez, D.M. & Medici, D., 2014. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Science Signal*, 7(344), p.re8.
- Gonzalvez, F. & Ashkenazi, A., 2010. New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL. *Oncogene*, 29(34), pp.4752–65.
- Goodwin, C.M. et al., 2015. Myeloid cell leukemia-1 is an important apoptotic survival factor in triple-negative breast cancer. *Cell Death and Differentiation*, 22(12), pp.1–9.
- Gozuacik, D. & Kimchi, A., 2004. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene*, 23(16), pp.2891–906.
- Green, D.R., 2016. The Cell's Dilemma, or the Story of Cell Death. An Entertainment in Three Acts. *FEBS Journal*, 283, p.n/a-n/a.

- Green, D.R., Galluzzi, L. & Kroemer, G., 2014. Metabolic control of cell death. *Science*, 345(6203), pp.1250256–1250256.
- Green, D.R. & Llambi, F., 2016. Cell Death Signaling.
- Griffith, T.S. et al., 1998. Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161(6), pp.2833–40.
- Griffith, T.S. et al., 1999. Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL. *The Journal of experimental medicine*, 189(8), pp.1343–54.
- Grimsley, C. & Ravichandran, K.S., 2003. Cues for apoptotic cell engulfment: eat-me, don't eat-me and come-get-me signals. *Trends in cell biology*, 13(12), pp.648–56.
- Grosse-Wilde, A. et al., 2008. TRAIL-R deficiency in mice enhances lymph node metastasis without affecting primary tumor development. *Journal of Clinical Investigation*, 118(1), pp.100–110.
- Grünert, S., Jechlinger, M. & Beug, H., 2003. Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 4(8), pp.657–65.
- Guo, W. et al., 2012. Slug and Sox9 Cooperatively Determine the Mammary Stem Cell State. *Cell*, 148(5), pp.1015–1028.
- Guo, X. & Wang, X.-F., 2009. Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways. *Cell research*, 19(1), pp.71–88.
- Gupta, S. et al., 2012. NOXA contributes to the sensitivity of PERK-deficient cells to ER stress. *FEBS Letters*, 586(22), pp.4023–4030.
- Guy, C.T., Cardiff, R.D. & Muller, W.J., 1996. Activated neu induces rapid tumor progression. *The Journal of biological chemistry*, 271(13), pp.7673–8.
- Haenssen, K.K. et al., 2010. ErbB2 Requires Integrin $\alpha 5$ for Anoikis Resistance via Src Regulation of Receptor Activity in Human Mammary Epithelial Cells. *Journal of Cell Science*, 123(Pt 8), pp.1373–1382.
- Hamasaki, M. et al., 2013. Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature*, 495(7441), pp.389–93.
- Han, D. et al., 2009. IRE1alpha kinase activation modes control alternate endoribonuclease outputs to determine divergent cell fates. *Cell*, 138(3), pp.562–75.

- Han, J. et al., 2008. Involvement of protective autophagy in TRAIL resistance of apoptosis-defective tumor cells. *Journal of Biological Chemistry*, 283(28), pp.19665–19677.
- Hardy, K.M., Booth, B.W. & Hendrix, M.J.C., 2011. NIH Public Access. , 15(2), pp.191–199.
- Harper, N. et al., 2003. Protein kinase C modulates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by targeting the apical events of death receptor signaling. *The Journal of biological chemistry*, 278(45), pp.44338–47.
- Hart, L.S. et al., 2012. ER stress-mediated autophagy promotes Myc-dependent transformation and tumor growth. *The Journal of clinical investigation*, 122(12), pp.4621–34.
- Hay, E.D., 1995. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta anatomica*, 154(1), pp.8–20.
- Haze, K. et al., 1999. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Molecular biology of the cell*, 10(11), pp.3787–99.
- He, S. et al., 2009. Receptor Interacting Protein Kinase-3 Determines Cellular Necrotic Response to TNF- α . *Cell*, 137(6), pp.1100–1111.
- Healy, S.J.M. et al., 2009. Targeting the endoplasmic reticulum-stress response as an anticancer strategy. *European Journal of Pharmacology*, 625(1–3), pp.234–246.
- Heerding, D.A. et al., 2008. Identification of 4-(2-(4-amino-1,2,5-oxadiazol-3-yl)-1-ethyl-7-(((3S)-3-piperidinylmethyl)oxy)-1H-imidazo[4,5-c]pyridin-4-yl)-2-methyl-3-butyn-2-ol (GSK690693), a novel inhibitor of AKT kinase. *Journal of medicinal chemistry*, 51(18), pp.5663–79.
- Heldin, C.H., Landstrom, M. & Moustakas, A., 2009. Mechanism of TGF-beta signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(2), pp.166–176.
- Henry-Mowatt, J. et al., 2004. Role of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis and cancer. *Oncogene*, 23(16), pp.2850–60.
- Henson, P.M., Bratton, D.L. & Fadok, V.A., 2001. Apoptotic cell removal. *Current Biology*, 11(19), pp.R795–R805.
- Herrero-Martín, G. et al., 2009. TAK1 activates AMPK-dependent cytoprotective autophagy in TRAIL-treated epithelial cells. *The EMBO journal*, 28(6), pp.677–85.

- De Herreros, A.G. et al., 2010. Snail family regulation and epithelial mesenchymal transitions in breast cancer progression. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 15(2), pp.135–147.
- Hetz, C., 2012. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(2), pp.89–102.
- Hetz, C. et al., 2011. The unfolded protein response: integrating stress signals through the stress sensor IRE1 α . *Physiological reviews*, 91(4), pp.1219–43.
- Holler, N. et al., 2000. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nature immunology*, 1(6), pp.489–495.
- Hollien, J. et al., 2009. Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *The Journal of cell biology*, 186(3), pp.323–31.
- Hollien, J. & Weissman, J.S., 2006. Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science (New York, N.Y.)*, 313(5783), pp.104–7.
- Hoogwater, F.J.H., Nijkamp, M.W., et al., 2010. Oncogenic K-Ras Turns Death Receptors Into Metastasis-Promoting Receptors in Human and Mouse Colorectal Cancer Cells. *Gastroenterology*, 138(7), pp.2357–2367.
- Hotte, S.J. et al., 2008. A phase 1 study of mapatumumab (fully human monoclonal antibody to TRAIL-R1) in patients with advanced solid malignancies. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 14(11), pp.3450–5.
- Hou, W. et al., 2010. Autophagic degradation of active caspase-8: A crosstalk mechanism between autophagy and apoptosis. *Autophagy*, 6(7), pp.891–900.
- Hu, P. et al., 2006. Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1 α -mediated NF- κ B activation and down-regulation of TRAF2 expression. *Molecular and cellular biology*, 26(8), pp.3071–84.
- Hua, Z.C. et al., 2003. A Function of Fas-Associated Death Domain Protein in Cell Cycle Progression Localized to a Single Amino Acid at Its C-Terminal Region. *Immunity*, 18(4), pp.513–521.
- Huang, R.Y.-J., Guilford, P. & Thiery, J.P., 2012. Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Cell Science*, 125(19).

- Huber, A.-L. et al., 2013. p58(IPK)-mediated attenuation of the proapoptotic PERK-CHOP pathway allows malignant progression upon low glucose. *Molecular cell*, 49(6), pp.1049–59.
- Huber, M.A., Kraut, N. & Beug, H., 2005. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Current opinion in cell biology*, 17(5), pp.548–58.
- Hughes, M.A. et al., 2016. Co-operative and Hierarchical Binding of c-FLIP and Caspase-8: A Unified Model Defines How c-FLIP Isoforms Differentially Control Cell Fate. *Molecular Cell*, 61(6), pp.834–849.
- Hughes, M.A. et al., 2009. Reconstitution of the Death-Inducing Signaling Complex Reveals a Substrate Switch that Determines CD95-Mediated Death or Survival. *Molecular Cell*, 35(3), pp.265–279.
- Hymowitz, S.G. et al., 2000. A Unique Zinc-Binding Site Revealed by a High-Resolution X-ray Structure of Homotrimeric Apo2L/TRAIL. *Biochemistry*, 39(4), pp.633–640.
- Hymowitz, S.G. et al., 1999. Triggering Cell Death: The Crystal Structure of Apo2L/TRAIL in a Complex with Death Receptor 5. *Molecular Cell*, 4(4), pp.563–571.
- Ichikawa, K. et al., 2001. Tumoricidal activity of a novel anti-human DR5 monoclonal antibody without hepatocyte cytotoxicity. *Nature medicine*, 7(8), pp.954–60.
- Irmeler, M. et al., 1997. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*, 388(6638), pp.190–5.
- Ishimura, N. et al., 2006. Trail induces cell migration and invasion in apoptosis-resistant cholangiocarcinoma cells. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 290(1), pp.G129-36.
- Ithimakin, S. et al., 2013. HER2 drives luminal breast cancer stem cells in the absence of HER2 amplification: Implications for efficacy of. *Cancer Research*, 73(5), pp.1635–1646.
- Iurlaro, R. & Muñoz Pinedo, C., 2015. Cell death induced by endoplasmic reticulum stress. *FEBS Journal*, p.n/a-n/a.
- Jäger, R. et al., 2012. The unfolded protein response at the crossroads of cellular life and death during endoplasmic reticulum stress. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, 104(5), pp.259–70.

- Jin, Z. et al., 2009. Cullin3-based polyubiquitination and p62-dependent aggregation of caspase-8 mediate extrinsic apoptosis signaling. *Cell*, 137(4), pp.721–35.
- Jin, Z. et al., 2004. Deficient tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor transport to the cell surface in human colon cancer cells selected for resistance to TRAIL-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 279(34), pp.35829–39.
- Jin, Z. & El-Deiry, W.S., 2006. Distinct signaling pathways in TRAIL- versus tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Molecular and cellular biology*, 26(21), pp.8136–48.
- Jorissen, R.N. et al., 2003. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Experimental cell research*, 284(1), pp.31–53.
- Jung, C.H. et al., 2009. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Molecular biology of the cell*, 20(7), pp.1992–2003.
- Juo, P. et al., 1998. Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Current biology : CB*, 8(18), pp.1001–8.
- Kajita, M., McClintic, K.N. & Wade, P.A., 2004. Aberrant expression of the transcription factors snail and slug alters the response to genotoxic stress. *Molecular and cellular biology*, 24(17), pp.7559–66.
- Kajiyama, H. et al., 2007. Chemoresistance to paclitaxel induces epithelial-mesenchymal transition and enhances metastatic potential for epithelial ovarian carcinoma cells. *International journal of oncology*, 31(2), pp.277–83.
- Kalluri, R. & Neilson, E.G., 2003. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *The Journal of clinical investigation*, 112(12), pp.1776–84.
- Kalluri, R. & Weinberg, R. a, 2009. Review series The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation*, 119(6), pp.1420–1428.
- Kantari, C. & Walczak, H., 2011. Caspase-8 and Bid: Caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813(4), pp.558–563.
- Kanzawa, T. et al., 2003. Induction of autophagic cell death in malignant glioma cells by arsenic trioxide. *Cancer research*, 63(9), pp.2103–8.

- Kanzawa, T. et al., 2004. Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell death and differentiation*, 11(4), pp.448–57.
- von Karstedt, S. et al., 2015. Cancer cell-autonomous TRAIL-R signaling promotes KRAS-driven cancer progression, invasion, and metastasis. *Cancer cell*, 27(4), pp.561–73.
- Kayagaki, N. et al., 1999. Expression and function of TNF-related apoptosis-inducing ligand on murine activated NK cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 163(4), pp.1906–13.
- Kelley, R.F. et al., 2005. Receptor-selective mutants of apoptosis-inducing ligand 2/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand reveal a greater contribution of death receptor (DR) 5 than DR4 to apoptosis signaling. *The Journal of biological chemistry*, 280(3), pp.2205–12.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. & Currie, A.R., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26(4), pp.239–57.
- Kim, K.K. et al., 2006. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(35), pp.13180–5.
- Kim, S.O., Ono, K. & Han, J., 2001. Apoptosis by pan-caspase inhibitors in lipopolysaccharide-activated macrophages. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 281(5), pp.L1095-105.
- Kiyono, K. et al., 2009. Autophagy Is Activated by TGF- β and Potentiates TGF- β -Mediated Growth Inhibition in Human Hepatocellular Carcinoma Cells. *Cancer Research*, 69(23).
- Klionsky, D.J. et al., 2012. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*, 8(4), p.445.
- Kohlhaas, S.L. et al., 2007. Receptor-mediated Endocytosis Is Not Required for Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL)-induced Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 282(17), pp.12831–12841.
- Kojima, E. et al., 2003. The function of GADD34 is a recovery from a shutoff of protein synthesis induced by ER stress: elucidation by GADD34-deficient mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(11), pp.1573–5.

- Kojima, Y. et al., 2011. Importin 1 Protein-mediated Nuclear Localization of Death Receptor 5 (DR5) Limits DR5/Tumor Necrosis Factor (TNF)-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL)-induced Cell Death of Human Tumor Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 286(50), pp.43383–43393.
- Komatsu, M. et al., 2006. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*, 441(7095), pp.880–884.
- Korkaya, H. et al., 2008. HER2 regulates the mammary stem/progenitor cell population driving tumorigenesis and invasion. *Oncogene*, 27(47), pp.6120–6130.
- Korkaya, H. & Wicha, M.S., 2013. HER2 and breast cancer stem cells: More than meets the eye. *Cancer Research*, 73(12), pp.3489–3493.
- Koschny, R. et al., 2007. TRAIL/bortezomib cotreatment is potentially hepatotoxic but induces cancer-specific apoptosis within a therapeutic window. *Hepatology*, 45(3), pp.649–658.
- Kourtis, N. & Tavernarakis, N., 2009. Autophagy and cell death in model organisms. *Cell death and differentiation*, 16(1), pp.21–30.
- Koyama-Honda, I. et al., 2013. Temporal analysis of recruitment of mammalian ATG proteins to the autophagosome formation site. *Autophagy*, 9(10), pp.1491–9.
- Kroemer, G. et al., 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*, 16(1), pp.3–11.
- Kroemer, G. & Levine, B., 2008. Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(12), pp.1004–1010.
- Krueger, A. et al., 2001. Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *The Journal of biological chemistry*, 276(23), pp.20633–40.
- Kurrey, N.K. et al., 2009. Snail and slug mediate radioresistance and chemoresistance by antagonizing p53-mediated apoptosis and acquiring a stem-like phenotype in ovarian cancer cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 27(9), pp.2059–68.
- Lacey, D.L. et al., 2012. Bench to bedside: elucidation of the OPG–RANK–RANKL pathway and the development of denosumab. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11(5), pp.401–419.
- Lamb, C.A., Yoshimori, T. & Tooze, S.A., 2013. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(12), pp.759–774.

- Lamhamedi-Cherradi, S.-E. et al., 2003. Defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL-/- mice. *Nature Immunology*, 4(3), pp.255–260.
- Lamouille, S. et al., 2012. TGF- β -induced activation of mTOR complex 2 drives epithelial-mesenchymal transition and cell invasion. *Journal of cell science*, 125(Pt 5), pp.1259–73.
- Lamouille, S. & Derynck, R., 2007. Cell size and invasion in TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway. *The Journal of cell biology*, 178(3), pp.437–51.
- Lamouille, S., Xu, J. & Derynck, R., 2014. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(3), pp.178–196.
- Laussmann, M.A. et al., 2011. Proteasome inhibition can induce an autophagy-dependent apical activation of caspase-8. *Cell death and differentiation*, 18(10), pp.1584–97.
- Lawrence, D. et al., 2001. Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nature Medicine*, 7(4), pp.383–385.
- Lee, A.-H., Iwakoshi, N.N. & Glimcher, L.H., 2003. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Molecular and cellular biology*, 23(21), pp.7448–59.
- Lee, A.S., 2007. GRP78 induction in cancer: therapeutic and prognostic implications. *Cancer research*, 67(8), pp.3496–9.
- Lee, M.K. et al., 2007. TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA. *The EMBO journal*, 26(17), pp.3957–67.
- Lee, T.-J. et al., 2006. Acquired TRAIL resistance in human breast cancer cells are caused by the sustained cFLIP(L) and XIAP protein levels and ERK activation. *Biochemical and biophysical research communications*, 351(4), pp.1024–30.
- Lemke, J. et al., 2014. Getting TRAIL back on track for cancer therapy. *Cell Death and Differentiation*, 21(9), pp.1350–1364.
- Levine, B. & Kroemer, G., 2008. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132(1), pp.27–42.
- Li, G. et al., 2009. Role of ERO1-alpha-mediated stimulation of inositol 1,4,5-triphosphate receptor activity in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *The Journal of cell biology*, 186(6), pp.783–92.

- Li, H. et al., 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 94(4), pp.491–501.
- Li, J., Lee, B. & Lee, A.S., 2006. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53. *The Journal of biological chemistry*, 281(11), pp.7260–70.
- Li, J. & Yuan, J., 2008. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*, 27(48), pp.6194–206.
- Li, T. et al., 2015. DDIT3 and KAT2A Proteins Regulate TNFRSF10A and TNFRSF10B Expression in Endoplasmic Reticulum Stress-mediated Apoptosis in Human Lung Cancer Cells. *The Journal of biological chemistry*, 290(17), pp.11108–18.
- Lim, B. et al., 2013. FOLFIRI plus dulanermin (rhApo2L/TRAIL) in a patient with BRAF-mutant metastatic colon cancer. *Cancer biology & therapy*, 14(8), pp.711–9.
- Lin, J.H. et al., 2009. Divergent effects of PERK and IRE1 signaling on cell viability. *PloS one*, 4(1), p.e4170.
- Lin, J.H. et al., 2007. IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5852), pp.944–9.
- Linkermann, A. & Green, D.R., 2014. Necroptosis. *The New England journal of medicine*, 370(5), pp.455–65.
- Llambi, F. et al., 2011. A unified model of mammalian BCL-2 protein family interactions at the mitochondria. *Molecular cell*, 44(4), pp.517–31.
- Lockshin, R.A. & Williams, C.M., 1964. Programmed cell death—II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *Journal of Insect Physiology*, 10(4), pp.643–649.
- Lockshin, R.A. & Zakeri, Z., 2001. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(7), pp.545–550.
- Logue, S.E. et al., 2013. New directions in ER stress-induced cell death. *Apoptosis*, 18(5), pp.537–546.
- van Loo, G. et al., 2002. The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell death and differentiation*, 9(10), pp.1031–42.
- Lowman, X.H. et al., 2010. The proapoptotic function of Noxa in human leukemia cells is regulated by

- the kinase Cdk5 and by glucose. *Molecular cell*, 40(5), pp.823–33.
- Lozy, F. et al., 2014. ERBB2 overexpression suppresses stress-induced autophagy and renders ERBB2-induced mammary tumorigenesis independent of monoallelic *Becn1* loss. *Autophagy*, 10(4), pp.662–676.
- Lu, M., Marsters, S., et al., 2014. E-Cadherin Couples Death Receptors to the Cytoskeleton to Regulate Apoptosis. *Molecular Cell*, 54(6), pp.987–998.
- Lu, M., Lawrence, D.A., et al., 2014. Opposing unfolded-protein-response signals converge on death receptor 5 to control apoptosis. *Science (New York, N.Y.)*, 345(6192), pp.98–101.
- Luo, J.-L. et al., 2004. Inhibition of NF- κ B in cancer cells converts inflammation-induced tumor growth mediated by TNF α to TRAIL-mediated tumor regression. *Cancer Cell*, 6(3), pp.297–305.
- Luo, X. et al., 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 94(4), pp.481–90.
- MacFarlane, M. et al., 1997. Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *The Journal of biological chemistry*, 272(41), pp.25417–20.
- Maiuri, M.C., Le Toumelin, G., et al., 2007. Functional and physical interaction between Bcl-XL and a BH3-like domain in Beclin-1. *The EMBO Journal*, 26(10), pp.2527–2539.
- Maiuri, M.C., Zalckvar, E., et al., 2007. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(9), pp.741–752.
- Marciniak, S.J. et al., 2004. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes & development*, 18(24), pp.3066–77.
- Marconi, M. et al., 2013. Constitutive localization of DR4 in lipid rafts is mandatory for TRAIL-induced apoptosis in B-cell hematologic malignancies. *Cell death & disease*, 4(10), p.e863.
- Mariani, S.M. & Krammer, P.H., 1998. Differential regulation of TRAIL and CD95 ligand in transformed cells of the T and B lymphocyte lineage. *European journal of immunology*, 28(3), pp.973–82.
- Marmor, M.D. & Yarden, Y., 2004. Role of protein ubiquitylation in regulating endocytosis of receptor tyrosine kinases. *Oncogene*, 23(11), pp.2057–2070.
- Marsters, S.A. et al., 1997. A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Current biology : CB*, 7(12), pp.1003–6.

- Martin, P., 1997. Wound Healing--Aiming for Perfect Skin Regeneration. *Science*, 276(5309).
- Martín-Pérez, R. et al., 2014. Activated ERBB2/HER2 licenses sensitivity to apoptosis upon endoplasmic reticulum stress through a PERK-dependent pathway. *Cancer research*, 74(6), pp.1766–77.
- Martín-Pérez, R., Niwa, M. & López-Rivas, A., 2012. ER stress sensitizes cells to TRAIL through down-regulation of FLIP and Mcl-1 and PERK-dependent up-regulation of TRAIL-R2. *Apoptosis*, 17(4), pp.349–363.
- Massague, J., 1990. The Transforming Growth Factor-beta Family. *Annual Review of Cell Biology*, 6(1), pp.597–641.
- Massagué, J., 2008. TGF β in Cancer. *Cell*, 134(2), pp.215–230.
- Massagué, J., 2012. TGF β signalling in context. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13(10), pp.616–30.
- Masuda, H. & Zhang, D., 2012. Role of epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Breast cancer research ...*, 136(2), pp.1–21.
- Mathieu, J. et al., 2004. Nodal and Fgf pathways interact through a positive regulatory loop and synergize to maintain mesodermal cell populations. *Development*, 131(3).
- Matthess, Y. et al., 2010. Cdk1/cyclin B1 controls Fas-mediated apoptosis by regulating caspase-8 activity. *Molecular and cellular biology*, 30(24), pp.5726–40.
- McCullough, K.D. et al., 2001. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Molecular and cellular biology*, 21(4), pp.1249–59.
- Meng, X.W., Heldebrant, M.P. & Kaufmann, S.H., 2002. Phorbol 12-myristate 13-acetate inhibits death receptor-mediated apoptosis in Jurkat cells by disrupting recruitment of Fas-associated polypeptide with death domain. *The Journal of biological chemistry*, 277(5), pp.3776–83.
- Merchant, M.S. et al., 2012. Phase I trial and pharmacokinetic study of lexatumumab in pediatric patients with solid tumors. *Journal of Clinical Oncology*, 30(33), pp.4141–4147.
- Mérino, D. et al., 2006. Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2. *Molecular and cellular biology*, 26(19), pp.7046–55.

- Meurette, O. et al., 2007. TRAIL Induces Receptor-Interacting Protein 1-Dependent and Caspase-Dependent Necrosis-Like Cell Death under Acidic Extracellular Conditions. *Cancer Research*, 67(1), pp.218–226.
- Micheau, O. et al., 2002. The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *The Journal of biological chemistry*, 277(47), pp.45162–71.
- Miettinen, P.J. et al., 1994. TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *The Journal of cell biology*, 127(6 Pt 2), pp.2021–2036.
- De Miguel, D. et al., 2016. Onto better TRAILs for cancer treatment. *Cell Death and Differentiation advance online publication*, 4(5), pp.733–747.
- Mills, K.R. et al., 2004. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is required for induction of autophagy during lumen formation in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(10), pp.3438–43.
- Mizushima, N. et al., 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 451(7182), pp.1069–75.
- Moasser, M.M., 2007. The oncogene HER2; its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene*, 26(45), pp.6469–6487.
- Moody, S.E. et al., 2005. The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence. *Cancer cell*, 8(3), pp.197–209.
- Morel, A.-P. et al., 2012. EMT inducers catalyze malignant transformation of mammary epithelial cells and drive tumorigenesis towards claudin-low tumors in transgenic mice. *PLoS genetics*, 8(5), p.e1002723.
- Morel, A.-P. et al., 2008. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS one*, 3(8), p.e2888.
- Morishima, N., Nakanishi, K. & Nakano, A., 2011. Activating transcription factor-6 (ATF6) mediates apoptosis with reduction of myeloid cell leukemia sequence 1 (Mcl-1) protein via induction of WW domain binding protein 1. *The Journal of biological chemistry*, 286(40), pp.35227–35.
- Morizane, Y. et al., 2005. X-linked inhibitor of apoptosis functions as ubiquitin ligase toward mature caspase-9 and cytosolic Smac/DIABLO. *Journal of biochemistry*, 137(2), pp.125–32.

- Morizot, A. et al., 2011. Chemotherapy overcomes TRAIL-R4-mediated TRAIL resistance at the DISC level. *Cell Death and Differentiation*, 18(4), pp.700–711.
- Moses, H. & Barcellos-hoff, M.H., 2011. TGF- β Biology in Mammary Development and Breast Cancer.
- Moustakas, A. & Heldin, C.-H., 2005. Non-Smad TGF-beta signals. *Journal of cell science*, 118(Pt 16), pp.3573–84.
- Mujcic, H. et al., 2013. Hypoxic activation of the PERK/eIF2 α arm of the unfolded protein response promotes metastasis through induction of LAMP3. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 19(22), pp.6126–37.
- Muller, W.J. et al., 1988. Single-step induction of mammary adenocarcinoma in transgenic mice bearing the activated c-neu oncogene. *Cell*, 54(1), pp.105–15.
- Muthuswamy, S.K. et al., 2001. ErbB2, but not ErbB1, reinitiates proliferation and induces luminal repopulation in epithelial acini. *Nature cell biology*, 3(9), pp.785–792.
- Muthuswamy, S.K., Gilman, M. & Brugge, J.S., 1999. Controlled dimerization of ErbB receptors provides evidence for differential signaling by homo- and heterodimers. *Molecular and cellular biology*, 19(10), pp.6845–57.
- Nagelkerke, A. et al., 2013. Hypoxia stimulates migration of breast cancer cells via the PERK/ATF4/LAMP3-arm of the unfolded protein response. *Breast Cancer Research*, 15(1), p.R2.
- Nagelkerke, A. et al., 2015. Hypoxic regulation of the PERK/ATF4/LAMP3-arm of the unfolded protein response in head and neck squamous cell carcinoma. *Head & neck*, 37(6), pp.896–905.
- Nahta, R. et al., 2006. Mechanisms of Disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer. *Nature Clinical Practice Oncology*, 3(5), pp.269–280.
- Nakagawa, H. et al., 2014. ER stress cooperates with hypernutrition to trigger TNF-dependent spontaneous HCC development. *Cancer cell*, 26(3), pp.331–43.
- Nguyen, T., Zhang, X.D. & Hersey, P., 2001. Relative resistance of fresh isolates of melanoma to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 7(3 Suppl), p.966s–973s.
- Nieminen, A.I. et al., 2007. c-Myc primed mitochondria determine cellular sensitivity to TRAIL-induced apoptosis. *The EMBO Journal*, 26(4), pp.1055–1067.

- Nieto, M.A. et al., 2016. Emt: 2016. *Cell*, 166(1), pp.21–45.
- Nieto, M.A., 2009. Epithelial-Mesenchymal Transitions in development and disease: Old views and new perspectives. *International Journal of Developmental Biology*, 53(8–10), pp.1541–1547.
- Nieto, M.A., 2002. THE SNAIL SUPERFAMILY OF ZINC-FINGER TRANSCRIPTION FACTORS. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(3), pp.155–166.
- Normanno, N. et al., 2006. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*, 366(1), pp.2–16.
- Normanno, N. et al., 2003. Target-based agents against ErbB receptors and their ligands: A novel approach to cancer treatment. *Endocrine-Related Cancer*, 10(1), pp.1–21.
- Novoa, I. et al., 2001. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2 α . *The Journal of cell biology*, 153(5), pp.1011–22.
- Nutt, L.K. et al., 2009. Metabolic Control of Oocyte Apoptosis Mediated by 14-3-3 ζ -Regulated Dephosphorylation of Caspase-2. *Developmental Cell*, 16(6), pp.856–866.
- O'Donnell, M.A. et al., 2007. Ubiquitination of RIP1 Regulates an NF- κ B-Independent Cell-Death Switch in TNF Signaling,
- Oberst, A. et al., 2011. Catalytic activity of the caspase-8-FLIP(L) complex inhibits RIPK3-dependent necrosis. *Nature*, 471(7338), pp.363–7.
- Oberst, A. & Green, D.R., 2011. It cuts both ways: reconciling the dual roles of caspase 8 in cell death and survival. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(11), pp.757–763.
- Ocaña, O.H. et al., 2012. Metastatic Colonization Requires the Repression of the Epithelial-Mesenchymal Transition Inducer Prrx1. *Cancer Cell*, 22(6), pp.709–724.
- Oft, M., Heider, K.-H. & Beug, H., 1998. TGF β signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis. *Current Biology*, 8(23), pp.1243–1252.
- Ohoka, N. et al., 2005. TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. *The EMBO journal*, 24(6), pp.1243–55.
- Olayioye, M.A. et al., 2000. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *The EMBO journal*, 19(13), pp.3159–67.
- Oliveras-Ferraros, C. et al., 2012. Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) confers primary

- resistance to trastuzumab (Herceptin). *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 11(21), pp.4020–32.
- Ortiz-Ferrón, G. et al., 2006. The mitogen-activated protein kinase pathway can inhibit TRAIL-induced apoptosis by prohibiting association of truncated Bid with mitochondria. *Cell death and differentiation*, 13(11), pp.1857–65.
- Ouyang, W. et al., 2011. Redistribution of DR4 and DR5 in lipid rafts accounts for the sensitivity to TRAIL in NSCLC cells. *International journal of oncology*, 39(6), pp.1577–86.
- Ozdamar, B. et al., 2005. Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity. *Science (New York, N.Y.)*, 307(5715), pp.1603–9.
- Ozören, N. & El-Deiry, W.S., 2002. Defining characteristics of Types I and II apoptotic cells in response to TRAIL. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 4(6), pp.551–7.
- Paik, S., Kim, C. & Wolmark, N., 2008. HER2 Status and Benefit from Adjuvant Trastuzumab in Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 358(13), pp.1409–1411.
- Pal, A. & Kleer, C.G., 2014. Three dimensional cultures: a tool to study normal acinar architecture vs. malignant transformation of breast cells. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (86), p.e51311.
- Palacios, C. et al., 2014. The long and winding road to cancer treatment: the TRAIL system. *Current pharmaceutical design*, 20(17), pp.2819–33.
- Pan, C.C. et al., 2015. Endoglin Regulation of Smad2 Function Mediates Beclin1 Expression and Endothelial Autophagy. *The Journal of biological chemistry*, 290(24), pp.14884–92.
- Pan, G. et al., 1997. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5327), pp.815–8.
- Pan, G. et al., 1997. The Receptor for the Cytotoxic Ligand TRAIL. *Science*, 276(5309).
- Park, S.M., Schickel, R. & Peter, M.E., 2005. Nonapoptotic functions of FADD-binding death receptors and their signaling molecules. *Current Opinion in Cell Biology*, 17(6), pp.610–616.
- Parrish, A.B., Freel, C.D. & Kornbluth, S., 2013. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(6), p.a008672.
- Pattengale, P.K. et al., 1989. Animal models of human disease. Pathology and molecular biology of spontaneous neoplasms occurring in transgenic mice carrying and expressing activated cellular

- oncogenes. *The American journal of pathology*, 135(1), pp.39–61.
- Pattingre, S. et al., 2005. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, 122(6), pp.927–39.
- Peinado, H., Olmeda, D. & Cano, A., 2007. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nature Reviews Cancer*, 7(6), pp.415–428.
- Peng, C. et al., 2011. Phosphorylation of caspase-8 (Thr-263) by ribosomal S6 kinase 2 (RSK2) mediates caspase-8 ubiquitination and stability. *The Journal of biological chemistry*, 286(9), pp.6946–54.
- Pennarun, B. et al., 2010. Playing the DISC: Turning on TRAIL death receptor-mediated apoptosis in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1805(2), pp.123–140.
- Pereira, E.R. et al., 2014. Endoplasmic reticulum (ER) stress and hypoxia response pathways interact to potentiate hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) transcriptional activity on targets like vascular endothelial growth factor (VEGF). *The Journal of biological chemistry*, 289(6), pp.3352–64.
- Peter, M.E., 2000. The TRAIL DISCussion: It is FADD and caspase-8! *Cell Death and Differentiation*, 7(9), pp.759–760.
- Petersen, O.W. et al., 1992. Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(19), pp.9064–8.
- Pijnenborg, R. et al., 1980. Trophoblastic invasion of human decidua from 8 to 18 weeks of pregnancy. *Placenta*, 1(1), pp.3–19.
- Pistritto, G. et al., 2002. Expression and transcriptional regulation of caspase-14 in simple and complex epithelia. *Cell Death and Differentiation*, 9(9), pp.995–1006.
- Pitti, R.M. et al., 1996. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *The Journal of biological chemistry*, 271(22), pp.12687–90.
- Polak, P. & Hall, M.N., 2009. mTOR and the control of whole body metabolism. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(2), pp.209–218.
- Polyak, K. & Weinberg, R.A., 2009. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nature reviews. Cancer*, 9(4), pp.265–73.

- Ponti, D. et al., 2006. Breast cancer stem cells: An overview. *European Journal of Cancer*, 42(9), pp.1219–1224.
- Ponti, D. et al., 2005. Isolation and In vitro Propagation of Tumorigenic Breast Cancer Cells with Stem / Progenitor Cell Properties. , (13), pp.5506–5512.
- Pop, C. et al., 2011. FLIP(L) induces caspase 8 activity in the absence of interdomain caspase 8 cleavage and alters substrate specificity. *The Biochemical journal*, 433(3), pp.447–57.
- Pop, C. & Salvesen, G.S., 2009. Human caspases: activation, specificity, and regulation. *The Journal of biological chemistry*, 284(33), pp.21777–81.
- Poukkula, M. et al., 2005. Rapid Turnover of c-FLIPshort Is Determined by Its Unique C-terminal Tail. *Journal of Biological Chemistry*, 280(29), pp.27345–27355.
- Powley, I.R. et al., 2016. Caspase-8 tyrosine-380 phosphorylation inhibits CD95 DISC function by preventing procaspase-8 maturation and cycling within the complex. *Oncogene*, 35(43), pp.5629–5640.
- Puisieux, A., Brabletz, T. & Caramel, J., 2014. Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. *Nature Cell Biology*, 16(6), pp.488–494.
- Puthalakath, H. et al., 2007. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell*, 129(7), pp.1337–49.
- van Raam, B.J. & Salvesen, G.S., 2012. Proliferative versus apoptotic functions of caspase-8 Hetero or homo: the caspase-8 dimer controls cell fate. *Biochimica et biophysica acta*, 1824(1), pp.113–22.
- Rahman, M. et al., 2009. TRAIL induces apoptosis in triple-negative breast cancer cells with a mesenchymal phenotype. *Breast Cancer Research and Treatment*, 113(2), pp.217–230.
- Ramesh, S. et al., 2008. TGF beta-mediated BIM expression and apoptosis are regulated through SMAD3-dependent expression of the MAPK phosphatase MKP2. *EMBO reports*, 9(10), pp.990–7.
- Ramírez-Peinado, S. et al., 2011. 2-deoxyglucose induces Noxa-dependent apoptosis in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer research*, 71(21), pp.6796–806.
- Rangel, M.C. et al., 2012. Role of Cripto-1 during epithelial-to-mesenchymal transition in development and cancer. *The American journal of pathology*, 180(6), pp.2188–200.

- Rastaldi, M.P. et al., 2002. Epithelial-mesenchymal transition of tubular epithelial cells in human renal biopsies. *Kidney International*, 62(1), pp.137–146.
- Ravi, R. et al., 2001. Regulation of death receptor expression and TRAIL/Apo2L-induced apoptosis by NF- κ B. *Nature Cell Biology*, 3(4), pp.409–416.
- Ravikumar, B. et al., 2010. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiological reviews*, 90(4), pp.1383–435.
- Reginato, M.J. et al., 2005. Bim regulation of lumen formation in cultured mammary epithelial acini is targeted by oncogenes. *Molecular and cellular biology*, 25(11), pp.4591–601.
- Reimertz, C. et al., 2003. Gene expression during ER stress-induced apoptosis in neurons: induction of the BH3-only protein Bbc3/PUMA and activation of the mitochondrial apoptosis pathway. *The Journal of cell biology*, 162(4), pp.587–97.
- Renna, M. et al., 2011. Autophagic substrate clearance requires activity of the syntaxin-5 SNARE complex. *Journal of cell science*, 124(Pt 3), pp.469–82.
- Rhim, A.D. et al., 2012. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell*, 148(1–2), pp.349–61.
- Rhodes, N. et al., 2008. Characterization of an Akt kinase inhibitor with potent pharmacodynamic and antitumor activity. *Cancer research*, 68(7), pp.2366–74.
- Ricci, M.S. et al., 2004. Direct Repression of FLIP Expression by c-myc Is a Major Determinant of TRAIL Sensitivity. *Molecular and Cellular Biology*, 24(19), pp.8541–8555.
- Ridley, A.J. et al., 2011. Life at the leading edge. *Cell*, 145(7), pp.1012–22.
- Riedl, S.J. & Shi, Y., 2004. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5(11), pp.897–907.
- Ron, D. & Hubbard, S.R., 2008. How IRE1 reacts to ER stress. *Cell*, 132(1), pp.24–6.
- Ron, D. & Walter, P., 2007. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(7), pp.519–529.
- Rossin, A. et al., 2009. Palmitoylation of the TRAIL receptor DR4 confers an efficient TRAIL-induced cell death signalling. *Biochemical Journal*, 419(1), pp.185–194.
- Roy, S.S. et al., 2014. Significance of PELP1/HDAC2/miR-200 regulatory network in EMT and

- metastasis of breast cancer. *Oncogene*, 33(28), pp.3707–16.
- Rubinstein, A.D. et al., 2011. The autophagy protein Atg12 associates with antiapoptotic Bcl-2 family members to promote mitochondrial apoptosis. *Molecular cell*, 44(5), pp.698–709.
- Rubinstein, A.D. & Kimchi, A., 2012. Life in the balance - a mechanistic view of the crosstalk between autophagy and apoptosis. *J Cell Sci*, 125(Pt 22), pp.5259–5268.
- Rubinsztein, D.C., Codogno, P. & Levine, B., 2012. Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. *Nature reviews. Drug discovery*, 11(9), pp.709–30.
- Rudner, J. et al., 2005. Type I and type II reactions in TRAIL-induced apoptosis -- results from dose-response studies. *Oncogene*, 24(1), pp.130–40.
- Rutkowski, D.T. & Kaufman, R.J., 2004. A trip to the ER: coping with stress. *Trends in Cell Biology*, 14(1), pp.20–28.
- Salvesen, G.S. & Dixit, V.M., 1999. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(20), pp.10964–7.
- Sarkar, S., 2013. Regulation of autophagy by mTOR-dependent and mTOR-independent pathways: autophagy dysfunction in neurodegenerative diseases and therapeutic application of autophagy enhancers. *Biochemical Society Transactions*, 41(5).
- Sarker, M. et al., 2002. Stimulation of the mitogen-activated protein kinase pathway antagonizes TRAIL-induced apoptosis downstream of BID cleavage in human breast cancer MCF-7 cells. *Oncogene*, 21(27), pp.4323–4327.
- Sarrió, D. et al., 2008. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer research*, 68(4), pp.989–97.
- Saunders, J.W., 1966. Death in Embryonic Systems. *Science*, 154(3749).
- Saveljeva, S. et al., 2015. Endoplasmic reticulum stress induces ligand-independent TNFR1-mediated necroptosis in L929 cells. *Cell death & disease*, 6, p.e1587.
- Scaffidi, C. et al., 2000. Phosphorylation of FADD/ MORT1 at serine 194 and association with a 70-kDa cell cycle-regulated protein kinase. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 164(3), pp.1236–42.
- Scaltriti, M. et al., 2007. Expression of p95HER2, a truncated form of the HER2 receptor, and

- response to Anti-HER2 therapies in breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 99(8), pp.628–638.
- Schechter, A.L. et al., 1984. The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature*, 312(5994), pp.513–6.
- Scheel, C. et al., 2011. Paracrine and Autocrine Signals Induce and Maintain Mesenchymal and Stem Cell States in the Breast. *Cell*, 145(6), pp.926–940.
- Schlegel, R.A. & Williamson, P., 2001. Phosphatidylserine, a death knell. *Cell death and differentiation*, 8(6), pp.551–63.
- Schneider, B.P. et al., 2008. Triple-negative breast cancer: Risk factors to potential targets. *Clinical Cancer Research*, 14(24), pp.8010–8018.
- Schneider, P., Bodmer, J.L., et al., 1997. Characterization of two receptors for TRAIL. *FEBS letters*, 416(3), pp.329–34.
- Schneider, P., Thome, M., et al., 1997. TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappaB. *Immunity*, 7(6), pp.831–6.
- Schneider-Brachert, W., Heigl, U. & Ehrenschrwender, M., 2013. Membrane trafficking of death receptors: Implications on signalling. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(7), pp.14475–14503.
- Schouten, J.P. et al., 2002. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic acids research*, 30(12), p.e57.
- Schröder, M. & Kaufman, R.J., 2005. The mammalian unfolded protein response. *Annual review of biochemistry*, 74, pp.739–89.
- Schweichel, J.-U. & Merker, H.-J., 1973. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology*, 7(3), pp.253–266.
- Sedger, L.M. et al., 2002. Characterization of the in vivo function of TNF- α -related apoptosis-inducing ligand, TRAIL/Apo2L, using TRAIL/Apo2L gene-deficient mice. *European Journal of Immunology*, 32(8), p.2246.
- Shalini, S. et al., 2015. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death and Differentiation*, 22(4), p.526.

- Sharp, D.A., Lawrence, D.A. & Ashkenazi, A., 2005. Selective knockdown of the long variant of cellular FLICE inhibitory protein augments death receptor-mediated caspase-8 activation and apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 280(19), pp.19401–9.
- Shen, J. et al., 2002. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Developmental cell*, 3(1), pp.99–111.
- Sheridan, J.P. et al., 1997. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5327), pp.818–21.
- Shimono, Y. et al., 2009. Downregulation of miRNA-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells. *Cell*, 138(3), pp.592–603.
- Shore, G.C., Papa, F.R. & Oakes, S.A., 2011. Signaling cell death from the endoplasmic reticulum stress response. *Curr Opin Cell Biol*, 23(2), pp.143–149.
- Siegel, R.M. et al., 2000. Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science (New York, N.Y.)*, 288(5475), pp.2354–7.
- Simons, K. & Ikonen, E., 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387(6633), pp.569–72.
- Šimová, S. et al., 2008. Arf and Rho GAP adapter protein ARAP1 participates in the mobilization of TRAIL-R1/DR4 to the plasma membrane. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 13(3), pp.423–36.
- Simpson, K.J. et al., 2008. Identification of genes that regulate epithelial cell migration using an siRNA screening approach. *Nature cell biology*, 10(9), pp.1027–38.
- Singh, A. & Settleman, J., 2010. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene*, 29(34), pp.4741–4751.
- Skromne, I. & Stern, C.D., 2001. Interactions between Wnt and Vg1 signalling pathways initiate primitive streak formation in the chick embryo. *Development (Cambridge, England)*, 128(15), pp.2915–27.
- Slamon, D.J. et al., 1987. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science (New York, N.Y.)*, 235(4785), pp.177–82.
- Slamon, D.J. et al., 1989. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science (New York, N.Y.)*, 244(4905), pp.707–12.

- Smith, C.C.T. & Yellon, D.M., 2011. Necroptosis, necrostatins and tissue injury. *Journal of cellular and molecular medicine*, 15(9), pp.1797–806.
- Soderstrom, T.S. et al., 2002. Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling in Activated T Cells Abrogates TRAIL-Induced Apoptosis Upstream of the Mitochondrial Amplification Loop and Caspase-8. *The Journal of Immunology*, 169(6), pp.2851–2860.
- Song, J.H. et al., 2007. Lipid Rafts and Nonrafts Mediate Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis-Inducing Ligand Induced Apoptotic and Nonapoptotic Signals in Non Small Cell Lung Carcinoma Cells. *Cancer Research*, 67(14), pp.6946–6955.
- Song, J.J. et al., 2010. c-Cbl acts as a mediator of Src-induced activation of the PI3K-Akt signal transduction pathway during TRAIL treatment. *Cellular Signalling*, 22(3), pp.377–385.
- Song, J.J. & Lee, Y.J., 2008. Differential cleavage of Mst1 by caspase-7/-3 is responsible for TRAIL-induced activation of the MAPK superfamily. *Cellular Signalling*, 20(5), pp.892–906.
- Sorrentino, A. et al., 2008. The type I TGF-beta receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase-independent manner. *Nature cell biology*, 10(10), pp.1199–207.
- Soule, H.D. et al., 1990. Isolation and Characterization of a Spontaneously Immortalized Isolation and Characterization of a Spontaneously Immortalized Human Breast. *Cancer*, pp.6075–6086.
- Sprick, M.R. et al., 2000. FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity*, 12(6), pp.599–609.
- Strasser, A., Cory, S. & Adams, J.M., 2011. Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. *The EMBO journal*, 30(18), pp.3667–83.
- Sun, L. et al., 2012. Mixed Lineage Kinase Domain-like Protein Mediates Necrosis Signaling Downstream of RIP3 Kinase. *Cell*, 148(1), pp.213–227.
- Suzuki, H.I., Kiyono, K. & Miyazono, K., 2010. Regulation of autophagy by transforming growth factor- β (TGF β) signaling. *Autophagy*, 6(5), pp.645–647.
- Szegezdi, E. et al., 2009. Bcl-2 family on guard at the ER. *American journal of physiology. Cell physiology*, 296(5), pp.C941-53.
- Tabas, I. & Ron, D., 2011. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nature cell biology*, 13(3), pp.184–190.

- Tai, W., Mahato, R. & Cheng, K., 2010. The role of HER2 in cancer therapy and targeted drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 146(3), pp.264–275.
- Tait, S.W. & Green, D.R., 2010. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature reviews.Molecular cell biology*, 11(9), pp.621–632.
- Takahashi, K. et al., 2013. Functional roles of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-DR5 interaction in B16F10 cells by activating the nuclear factor- κ B pathway to induce metastatic potential. *Cancer science*, 104(5), pp.558–62.
- Takeda, K. et al., 2001. Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nature Medicine*, 7(1), pp.94–100.
- Talmadge, J.E. & Fidler, I.J., 2010. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer research*, 70(14), pp.5649–69.
- Tam, W.L. & Weinberg, R.A., 2013. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nature medicine*, 19(11), pp.1438–49.
- Taube, J.H. et al., 2010. Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(35), pp.15449–54.
- Taylor, R.C., Cullen, S.P. & Martin, S.J., 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(3), pp.231–241.
- Tchafa, a. M. et al., 2015. EMT Transition Alters Interstitial Fluid Flow-Induced Signaling in ERBB2-Positive Breast Cancer Cells. *Molecular Cancer Research*, 13(4), pp.755–764.
- Thiery, J.P. et al., 2009. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell*, 139(5), pp.871–890.
- Thiery, J.P. & Sleeman, J.P., 2006. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7(2), pp.131–42.
- Thorburn, J. et al., 2014. Autophagy controls the kinetics and extent of mitochondrial apoptosis by regulating PUMA levels. *Cell Reports*, 7(1), pp.45–52.
- Trabzuni, D., Famulski, K.S. & Ahmad, M., 2000. Functional analysis of tumour necrosis factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): cysteine-230 plays a critical role in the homotrimerization and biological activity of this novel tumoricidal cytokine. *The Biochemical*

- journal*, 350 Pt 2(Pt 2), pp.505–10.
- Tran, H.D. et al., 2014. Transient SNAIL1 expression is necessary for metastatic competence in breast cancer. *Cancer research*, 74(21), pp.6330–40.
- Trauzold, A. et al., 2006. TRAIL promotes metastasis of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene*, 25(56), pp.7434–7439.
- Truneh, A. et al., 2000. Temperature-sensitive differential affinity of TRAIL for its receptors. DR5 is the highest affinity receptor. *The Journal of biological chemistry*, 275(30), pp.23319–25.
- Tsai, J.H. et al., 2012. Spatiotemporal Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition Is Essential for Squamous Cell Carcinoma Metastasis. *Cancer Cell*, 22(6), pp.725–736.
- Tschopp, J., Irmeler, M. & Thome, M., 1998. Inhibition of fas death signals by FLIPs. *Current opinion in immunology*, 10(5), pp.552–8.
- Tsujimoto, Y., Nakagawa, T. & Shimizu, S., 2006. Mitochondrial membrane permeability transition and cell death. *Biochimica et biophysica acta*, 1757(9–10), pp.1297–300.
- Tsukada, M. & Ohsumi, Y., 1993. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*, 333(1–2), pp.169–74.
- Twomey, J.D. et al., 2015. Spatial dynamics of TRAIL death receptors in cancer cells. *Drug Resistance Updates*, 19, pp.13–21.
- Upton, J.-P. et al., 2008. Caspase-2 Cleavage of BID Is a Critical Apoptotic Signal Downstream of Endoplasmic Reticulum Stress. *Molecular and Cellular Biology*, 28(12), pp.3943–3951.
- Urano, F. et al., 2000. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5453), pp.664–6.
- Urrea, H. et al., 2013a. When ER stress reaches a dead end. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1833(12), pp.3507–3517.
- Urrea, H. et al., 2013b. When ER stress reaches a dead end. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(12), pp.3507–3517.
- Vaculová, A. et al., 2006. Different modulation of TRAIL-induced apoptosis by inhibition of pro-survival pathways in TRAIL-sensitive and TRAIL-resistant colon cancer cells. *FEBS Letters*, 580(28–29), pp.6565–6569.

- Vara, J.Á.F. et al., 2004. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 30(2), pp.193–204.
- Varfolomeev, E. et al., 2005. Molecular determinants of kinase pathway activation by Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *The Journal of biological chemistry*, 280(49), pp.40599–608.
- Vega, S. et al., 2004. Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. , pp.1131–1143.
- Vercammen, D. et al., 1998. Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *The Journal of experimental medicine*, 187(9), pp.1477–85.
- Vilimanovich, U. & Bumbasirevic, V., 2008. TRAIL induces proliferation of human glioma cells by c-FLIPL-mediated activation of ERK1/2. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(5), pp.814–826.
- von Karstedt, S. et al., 2015. Cancer Cell-Autonomous TRAIL-R Signaling Promotes KRAS-Driven Cancer Progression, Invasion, and Metastasis. *Cancer Cell*, 27(4), pp.561–573.
- Vucic, D., Dixit, V.M. & Wertz, I.E., 2011. Ubiquitylation in apoptosis: a post-translational modification at the edge of life and death. *Nature Rev Mol Cell Biol*, 12(7), pp.439–452.
- Wagner, K.W. et al., 2007. Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL. *Nature Medicine*, 13(9), pp.1070–1077.
- Wainberg, Z.A. et al., 2013. A phase 1B study of dulanermin in combination with modified FOLFOX6 plus bevacizumab in patients with metastatic colorectal cancer. *Clinical colorectal cancer*, 12(4), pp.248–54.
- Wajant, H., 2004. TRAIL and NFkappaB signaling--a complex relationship. *Vitamins and hormones*, 67, pp.101–32.
- Walczak, H., 2011. TNF and ubiquitin at the crossroads of gene activation, cell death, inflammation, and cancer. *Immunological reviews*, 244(1), pp.9–28.
- Walczak, H. et al., 1997. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *The EMBO journal*, 16(17), pp.5386–97.
- Walczak, H. et al., 1999. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nature medicine*, 5(2), pp.157–63.
- Walter, P. et al., 2011. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic

- regulation. *Science (New York, N.Y.)*, 334(6059), pp.1081–6.
- Wang, F. et al., 1998. Reciprocal interactions between beta1-integrin and epidermal growth factor receptor in three-dimensional basement membrane breast cultures: a different perspective in epithelial biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(25), pp.14821–14826.
- Wang, J. et al., 2008. Transforming growth factor beta induces apoptosis through repressing the phosphoinositide 3-kinase/AKT/survivin pathway in colon cancer cells. *Cancer research*, 68(9), pp.3152–60.
- Wang, M. & Kaufman, R.J., 2014. The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. *Nature Reviews Cancer*, 14(9), pp.581–597.
- Wang, S.E. et al., 2006. HER2 kinase domain mutation results in constitutive phosphorylation and activation of HER2 and EGFR and resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Cell*, 10(1), pp.25–38.
- Wang, T.T. & Jeng, J., 2000. Coordinated regulation of two TRAIL-R2/KILLER/DR5 mRNA isoforms by DNA damaging agents, serum and 17beta-estradiol in human breast cancer cells. *Breast cancer research and treatment*, 61(1), pp.87–96.
- Weaver, V.M. et al., 2002. Beta4 integrin-dependent formation of polarized three-dimensional architecture confers resistance to apoptosis in normal and malignant mammary epithelium. *Cancer Cell*, 2(September), pp.205–216.
- Wei, G. et al., 2012. Chemical Genomics Identifies Small-Molecule MCL1 Repressors and BCL-xL as a Predictor of MCL1 Dependency. *Cancer Cell*, 21(4), pp.547–562.
- Wei, Y. et al., 2008. JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Molecular cell*, 30(6), pp.678–88.
- Weiner, D.B. et al., 1989. A point mutation in the neu oncogene mimics ligand induction of receptor aggregation. *Nature*, 339(6221), pp.230–1.
- Wellner, U. et al., 2009. The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nature Cell Biology*, 11(12), pp.1487–1495.
- Westphal, D. et al., 2011. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813(4), pp.521–531.

- Wharton, K. & Derynck, R., 2009. TGFbeta family signaling: novel insights in development and disease. *Development (Cambridge, England)*, 136(22), pp.3691–3697.
- Wiezorek, J., Holland, P. & Graves, J., 2010. Death Receptor Agonists as a Targeted Therapy for Cancer. *Clinical Cancer Research*, 16(6).
- Wiley, S.R. et al., 1995. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*, 3(6), pp.673–82.
- Willis, S.N. et al., 2007. Apoptosis Initiated When BH3 Ligands Engage Multiple Bcl-2 Homologs, Not Bax or Bak. *Science*, 315(5813).
- Wirawan, E. et al., 2010. Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. *Cell death & disease*, 1, p.e18.
- Woehlbier, U. & Hetz, C., 2011. Modulating stress responses by the UPRosome: A matter of life and death. *Trends in Biochemical Sciences*, 36(6), pp.329–337.
- Wu, Y. et al., 2009. Stabilization of snail by NF-kappaB is required for inflammation-induced cell migration and invasion. *Cancer cell*, 15(5), pp.416–28.
- Wu, Y.-H. et al., 2012. Removal of syndecan-1 promotes TRAIL-induced apoptosis in myeloma cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 188(6), pp.2914–21.
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F.R. & Currie, A.R., 1980. Cell Death: The Significance of Apoptosis. *International Review of Cytology*, 68, pp.251–306.
- Xu, J. et al., 2010. Activation of the Akt Survival Pathway Contributes to TRAIL Resistance in Cancer Cells D.-Y. Jin, ed. *PLoS ONE*, 5(4), p.e10226.
- Xu, J., Lamouille, S. & Derynck, R., 2009. TGF-β-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell research*, 19(2), pp.156–172.
- Yamaguchi, H. & Wang, H.G., 2004. CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(44), pp.45495–45502.
- Yamashita, M. et al., 2008. TRAF6 mediates Smad-independent activation of JNK and p38 by TGF-beta. *Molecular cell*, 31(6), pp.918–24.

- Yang, A.D. et al., 2006. Chronic oxaliplatin resistance induces epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer cell lines. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 12(14 Pt 1), pp.4147–53.
- Yang, J. et al., 2008. Rb/E2F4 and Smad2/3 link survivin to TGF-beta-induced apoptosis and tumor progression. *Oncogene*, 27(40), pp.5326–38.
- Yang, J. et al., 2004. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*, 117(7), pp.927–39.
- Yang, M.-H. et al., 2010. Bmi1 is essential in Twist1-induced epithelial–mesenchymal transition. *Nature Cell Biology*, 12(10), pp.982–992.
- Yang, Z. & Klionsky, D.J., 2010. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nature Cell Biology*, 12(9), pp.814–822.
- Yarden, Y. & Sliwkowski, M.X., 2001. Untangling the ErbB signalling network. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(2), pp.127–137.
- Ye, X. et al., 2015. Distinct EMT programs control normal mammary stem cells and tumour-initiating cells. *Nature*, 525(7568), pp.256–260.
- Ye, X. & Weinberg, R.A., 2015. Epithelial-Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression. *Trends in Cell Biology*, 25(11), pp.675–686.
- Yerbes, R. et al., 2011. Cellular FLIPL plays a survival role and regulates morphogenesis in breast epithelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813(1), pp.168–178.
- Yerbes, R. et al., 2012. Control of FLIPL expression and TRAIL resistance by the extracellular signal-regulated kinase1/2 pathway in breast epithelial cells. *Cell Death and Differentiation*, 19(12), pp.1908–1916.
- Yoshida, H. et al., 2000. ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Molecular and cellular biology*, 20(18), pp.6755–67.
- Yoshida, H. et al., 2001. XBP1 mRNA Is Induced by ATF6 and Spliced by IRE1 in Response to ER Stress to Produce a Highly Active Transcription Factor. *Cell*, 107(7), pp.881–891.
- Yoshida, T. et al., 2007. Glycosylation modulates TRAIL-R1/death receptor 4 protein: different

- regulations of two pro-apoptotic receptors for TRAIL by tunicamycin. *Oncology reports*, 18(5), pp.1239–42.
- Young, M.M. et al., 2012. Autophagosomal membrane serves as platform for intracellular death-inducing signaling complex (iDISC)-mediated caspase-8 activation and apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 287(15), pp.12455–68.
- Yousefi, S. et al., 2006. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nature cell biology*, 8(10), pp.1124–32.
- Yuan, J. et al., 1993. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. *Cell*, 75(4), pp.641–652.
- Zeisberg, E.M. et al., 2007. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nature medicine*, 13(8), pp.952–61.
- Zeisberg, M. et al., 2007. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *The Journal of biological chemistry*, 282(32), pp.23337–47.
- Zerafa, N. et al., 2005. Cutting edge: TRAIL deficiency accelerates hematological malignancies. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 175(9), pp.5586–90.
- Zhang, J. et al., 2014. TGF- β -induced epithelial-to-mesenchymal transition proceeds through stepwise activation of multiple feedback loops. *Science signaling*, 7(345), p.ra91.
- Zhang, X.D. et al., 2003. Activation of ERK1/2 protects melanoma cells from TRAIL-induced apoptosis by inhibiting Smac/DIABLO release from mitochondria. *Oncogene*, 22(19), pp.2869–81.
- Zhang, X.D. et al., 2000. Differential localization and regulation of death and decoy receptors for TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in human melanoma cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 164(8), pp.3961–70.
- Zhang, X.D. et al., 1999. Relation of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor and FLICE-inhibitory protein expression to TRAIL-induced apoptosis of melanoma. *Cancer research*, 59(11), pp.2747–53.
- Zhang, Y., Yoshida, T. & Zhang, B., 2009. TRAIL induces endocytosis of its death receptors in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Biology and Therapy*, 8(10), pp.917–922.
- Zhang, Y. & Zhang, B., 2008. TRAIL resistance of breast cancer cells is associated with constitutive endocytosis of death receptors 4 and 5. *Molecular cancer research : MCR*, 6(12), pp.1861–71.

Zheng, X. et al., 2015. Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature*, 527(7579), pp.525–530.

Zhu, H. et al., 2014. Activating Transcription Factor 4 Promotes Esophageal Squamous Cell Carcinoma Invasion and Metastasis in Mice and Is Associated with Poor Prognosis in Human Patients V. V. Kalinichenko, ed. *PLoS ONE*, 9(7), p.e103882.

Anexo: Publicaciones

ANEXO: PUBLICACIONES

- ◆ **Oncogenic transformation of human breast epithelial cells by p95Her2/611CTF leads to increased sensitivity to metabolic stress through a caspase-8-dependent apoptotic process.** Rosa Martín-Pérez, Rosario Yerbes, Rocío Mora-Molina, **Ana Cano-González**, Joaquín Arribas, Massimiliano Mazzone, Abelardo López-Rivas and Carmen Palacios (*Manuscrito en preparación*).
- ◆ **Opposing roles of TGF- β and EGF in the regulation of TRAIL-induced apoptosis in human breast epithelial cells.** Ana Cano-González and Abelardo López-Rivas. BBA-Molecular Cell Research (2016). Volume 1863, Issue 8, 2104-2114.
- ◆ **Structural Basis for Inhibition of the Histone Chaperone Activity of SET/TAF-I β by Cytochrome C.** Katuska González-Arzola, Irene Díaz-Moreno, **Ana Cano-González**, Antonio Díaz-Quintana, Adrián Velázquez-Campoy, Blas Moreno-Beltrán, Abelardo López-Rivas and Miguel Á. de la Rosa. PNAS 2015 112 (32) 9908-9913;
- ◆ **Activated HER2 licenses sensitivity to apoptosis upon endoplasmic reticulum stress through a PERK-dependent pathway.** Rosa Martín-Pérez, Carmen Palacios*, Rosario Yerbes*, **Ana Cano-González**, Daniel Iglesias-Serret, Joan Gil, Mauricio J. Reginato and Abelardo López-Rivas. (*equal contribution) Cancer Research (2014) 74: 1766-1777.
- ◆ **The long and winding road to cancer treatment: the trail system.** Carmen Palacios, Rosario Yerbes, Tania Sánchez-Pérez, Rosa Martín-Pérez, **Ana Cano-González** and Abelardo López-Rivas. Current Pharmaceutical Design, 2014, 20, 2819-2833.